

口腔苔藓样损害中淋巴滤泡样结构表征 及免疫细胞组成的实验研究

李晶晶^{1,2}, 宋晨成², 李晨曦², 夏荣辉², 邓一文², 王宇峰^{2*}, 唐国瑶^{1,2*}

(1.潍坊医学院口腔医学院, 山东 潍坊 261021;

2.上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院 口腔黏膜病科, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011)

[摘要] 目的: 评估口腔苔藓样损害(oral lichenoid lesion, OLL)中是否具有三级淋巴结构(tertiary lymphoid structure, TLS), 并分析其免疫细胞的组成特征。方法: 收集正常口腔黏膜组织、口腔扁平苔藓组织(oral lichen planus, OLP)和口腔苔藓样损害组织(oral lichenoid tissue reaction, OLTR)各30例, 行苏木精-伊红(H-E)染色, 评估各组织中是否存在 TLS 样结构。利用免疫组织化学染色鉴定 TLS 相关的 B 细胞 (CD19⁺、CD20⁺)、T 细胞 (CD3⁺)、滤泡树突状细胞 (CD21⁺)、生发中心 (Bcl-6⁺) 和血管 (CD34⁺ PNA⁺)、淋巴管 (CD34⁺ Gp36⁺) 结构在各组中的数量和分布特点。在组织病理和分子标志物水平, 评价 TLS 在 OLL 中的形态学表现。利用 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计学分析。结果: OLP 组和 OLTR 组中, 分别有 46.7% (14/30) 和 23.4% (7/30) 的病例存在 TLS 样结构, TLS 样结构出现的频率与疾病类型无关 ($P>0.05$)。与对照组相比, OLP 组和 OLTR 组各分子标志物均高表达, 其中, CD19、CD20 和 CD21 在 OLP 组的表达具有 TLS 的形态结构特点。OLP 组和 OLTR 组中, Bcl-6 (平均积分吸光值分别为 $15\ 498\pm 15\ 108 : 1\ 841\pm 2\ 276, P<0.000\ 1$)、CD20 ($13\ 067\pm 9\ 049 : 7\ 695\pm 5\ 159, P<0.05$)、CD21 ($13\ 968\pm 14\ 560 : 2\ 552\pm 2\ 584, P<0.000\ 1$)、PNA⁺ ($10\ 328\pm 10\ 383 : 1\ 756\pm 1\ 570, P<0.000\ 1$) 和 Gp36 ($12\ 778\pm 12\ 390 : 2\ 313\pm 2\ 578, P<0.000\ 1$) 的表达水平存在显著差异, 但表达差异不能作为鉴别疾病类型的依据。结论: OLL 中存在 TLS, 以非经典 TLS 为主, 可见经典 TLS; CD20、CD21 可作为鉴定 OLL 损害组织中 TLS 的标志物, 但 TLS 不能作为鉴别 OLP 和 OLTR 的依据。

[关键词] 口腔苔藓样损害; 口腔扁平苔藓; 三级淋巴结构; 淋巴滤泡样结构

[中图分类号] R781.5

[文献标志码] A

DOI: 10.19439/j.sjos.2021.02.001

Experimental study on the structure and immune cell phenotypes of the lymphoid tissues in oral lichenoid lesions

LI Jing-jing^{1,2}, SONG Chen-cheng², LI Chen-xi², XIA Rong-hui², DENG Yi-wen², WANG Yu-feng², TANG Guo-yao^{1,2}. (1.College of Stomatology, Weifang Medical University, Weifang 261021, Shandong Province; 2.Department of Oral Medicine, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology & Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China)

[Abstract] PURPOSE: To evaluate the existence of tertiary lymphoid structures (TLS) in oral lichenoid lesions and its compositional characteristics of immune cells. **METHODS:** Tissue samples of normal oral mucosa, oral lichen planus (OLP) and oral lichenoid tissue reaction (OLTR) were collected, thirty cases in each group. Hematoxylin-eosin (H-E) staining was performed to identify the TLS-like structures, and immunohistochemistry (IHC) staining was applied to assess the structure and amount of infiltrating CD3⁺ T cells, CD19⁺, CD20⁺ B cells, CD21⁺ follicular dendritic cells (FDC), Bcl-6⁺ germinal centers, CD34⁺ PNA⁺ venules and CD34⁺ Gp36⁺ micro lymphatic vessels in TLS of OLL. Histopathology and molecular markers were used to evaluate the morphological performance of TLS in OLL. Chi-square test (Fisher exact probability method) was applied to compare the proportion of TLS in each group; integral optical density (IOD) method was

[收稿日期] 2020-02-17; [修回日期] 2020-04-21

[基金项目] 国家自然科学基金(81730030、81970937);

上海交通大学医学院附属第九人民医院种子基金(JYZZ046)

[作者简介] 李晶晶(1992-), 女, 在读硕士研究生, E-mail: 593287009@qq.com

[通信作者] 唐国瑶, E-mail: tanggy@shsmu.edu.cn; 王宇峰,

E-mail: dr_wangyufeng@126.com。* 共同通信作者

©2021 年版权归《上海口腔医学》编辑部所有

used to calculate the expression level of each molecular marker, nonparametric *t* test (Mann-Whitney *U* test) was employed to analyze their difference. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 7.0 software. **RESULTS:** In OLP group and OLTR group, 46.7% (14/30) and 23.4% (7/30) cases had TLS-like structures, respectively. The frequency of TLS-like structures was not correlated with the type of disease ($P>0.05$). Compared with the control group, the molecular markers in OLP group and OLTR group were highly expressed, and the expression of CD19, CD20, and CD21 in OLP group had morphological and structural characteristics of TLS. The expression of Bcl-6 (mean and standard deviation of IOD were $15\,498\pm 15\,108$ vs. $1\,841\pm 2\,276$, $P<0.000\,1$), CD20 ($13\,067\pm 9\,049$ vs. $7\,695\pm 5\,159$, $P<0.05$), CD21 ($13\,968\pm 14\,560$ vs. $2\,552\pm 2\,584$, $P<0.000\,1$), PNA_d ($10\,328\pm 10\,383$ vs. $1\,756\pm 1\,570$, $P<0.000\,1$) and Gp36 ($12\,778\pm 12\,390$ vs. $2\,313\pm 2\,578$, $P<0.000\,1$) showed significant differences between OLP and OLTR tissues, but it could not be used as the criteria for identifying the type of diseases without morphological characters. **CONCLUSIONS:** TLS exists in OLL lesions, mainly presented as non-classical forms. The classical forms can be occasionally found. CD20 and CD21 can be used as the biomarkers to identify the TLS in OLL. TLS can not be used as the diagnosing criteria for identifying OLP or OLTR.

[Key words] Oral lichenoid lesion; Oral lichen planus; Tertiary lymphatic structure; Lymphoid follicle-like structure
Shanghai J Stomatol, 2021, 30(2):113-119.

口腔苔藓样损害 (oral lichenoid lesion, OLL) 是口腔黏膜病中最常见的疾病类型之一^[1], 主要包括口腔扁平苔藓 (oral lichen plauns, OLP) 和口腔黏膜苔藓样反应 (oral lichenoid tissue reaction, OLTR) 两大类, 后者又可分为接触性苔藓样反应、药物性苔藓样反应、慢性移植物抗宿主病及其他^[2]。OLL 的病因不明, 基本病理表现是固有层内以 T 淋巴细胞为主的炎症细胞浸润带、上皮基底层细胞液化变性和过度死亡, 提示该疾病是 T 细胞介导的免疫性炎症^[3], 但是 OLL 中的自身反应性 T 细胞的来源和诱导分化机制目前尚不清楚。研究^[4]发现, OLL 患者外周血缺少明确的寡克隆性自身反应性 T 细胞, 提示 OLL 损害中浸润的 T 细胞可能来源于损害局部的免疫诱导和分化, 但在口腔黏膜界面是否具有诱导 T 细胞分化的组织结构, 目前缺乏相关研究。

T 细胞的诱导分化通常发生在淋巴结、脾脏、扁桃体等二级淋巴器官中, 也可以发生在其他异位淋巴结构中。在慢性炎症性疾病中, 普遍存在“三级淋巴结构 (tertiary lymphoid structures, TLS)”或“三级淋巴器官 (tertiary lymphoid organs, TLO)”^[5]。TLS 不是由胚胎发育而来, 而是一种新生的、异位的淋巴结构, 其细胞成分、形态和功能均与次级淋巴器官中的淋巴滤泡相似, 是一种重要的异位抗原提呈结构^[6-7], 在自身免疫病、器官移植和感染中发挥重要作用。在界面皮炎类慢性炎症 (如红斑狼疮) 的研究中, 已证实损害的局部组织中存在有诱导性淋巴样组织或 TLS, 显示局部损害也存在诱导 T 细胞分化和活化的免疫病理结构和基础^[8], 但这一结构在以 OLL 为代表的口腔黏膜上皮界面慢性炎症中缺乏证据。本

研究通过组织病理学检查结合免疫组织化学染色, 从形态学和组织病理学角度, 观察 TLS 是否存在于 OLL 中, 并分析其是否具有结构特征或特异性表现形式, 为今后研究 OLL 类黏膜界面炎症的免疫诱导提供组织病理学证据。

1 材料与方法

1.1 标本收集

从上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔病理科收集组织切片样本 80 例。其中, OLP 组 30 例, OLTR 组 30 例 (即 OLL 组共 60 例), 对照组 (正常口腔黏膜组织) 20 例。OLL 组男 31 例, 女 29 例, 平均年龄 (47.7 ± 12.8) 岁; 对照组男 14 例, 女 6 例, 平均年龄 (37.8 ± 16.7) 岁。OLP 组和 OLTR 组均基于组织病理学诊断结果, 遵循世界卫生组织 2003 年的推荐诊断标准。

1.2 试剂和仪器

免疫组织化学染色一抗信息见表 1。EDTA 抗原修复液 ($50\times$, pH=8.0, 北京索莱宝科技有限公司, 货号: C1034); 山羊血清 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: SL038); 聚合 HRP 标记抗兔/鼠 IgG 免疫组织化学染色二抗 (武汉博士德生物工程有限公司, 货号: 12K20B04); DAB 显色液 (武汉博士德生物工程有限公司, 货号: AR1022); 正置荧光显微镜 (奥林巴斯, 日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 H-E 染色 标本用 4% 甲醛固定后, 常规 H-E 染色, 镜下观察上皮-固有层淋巴细胞浸润带中是否具有 TLS 样结构并计数。

表 1 免疫组织化学染色的抗体信息

Table 1 Antibody used for of immunohistochemical staining

名称	生产商	货号 and 种属	克隆号	稀释比例	标记的细胞/结构
Bel-6	Abcam(美国)	Ab172610, Rb anti-Hu monoclonal	EPR11410	1:150	巨噬细胞/生发中心
CD3	Abcam(美国)	Ab16669, Rb anti-Hu monoclonal	SP7	1:100	T 细胞
CD19	Abcam(美国)	Ab227688, Rb anti-Hu monoclonal	SP291	1:50	B 细胞
CD20	Abcam(美国)	Ab78237, Rb anti-Hu monoclonal	EP459Y	1:200	B 细胞
CD21	Abcam(美国)	Ab75985, Rb anti-Hu monoclonal	EP3093	1:200	滤泡树突状细胞
CD34	Abcam(美国)	Ab81289, Rb anti-Hu monoclonal	EP273Y	1:2 000	内皮细胞
PNA _d	Abcam(美国)	Ab111710, Rb anti-Hu polyclonal	N/A	1:200	高内皮微静脉
Gp36(Podoplanin)	Abcam(美国)	Ab10288, Ms anti-Hu monoclonal	18H5	1:200	淋巴管内皮细胞

1.3.2 免疫组织化学染色 将每组的第 1 张切片进行 H-E 染色后,其余切片进行连续切片免疫组织化学染色。蜡切片经烤片脱蜡后,用 EDTA 抗原液(1×, pH=8.0)行热抗原修复(95 °C、30 min);一抗 4 °C 孵育过夜;聚合 HRP 标记抗兔/鼠 IgG,免疫组织化学二抗常温孵育 30 min;DAB 显色 6~10 min,显微镜下观察显色情况。通过对 TLS 中相关结构或细胞的分子标志物进行免疫组织化学染色,用以鉴定 TLS 结构,并评价其组成特点。

1.4 统计学分析

采用 Fisher 确切概率检验比较不同组间 TLS 样结构的数量差异。利用 Image Pro Plus 6.0 软件计算免疫组织化学阳性染色的积分吸光度值(integral optical density, IOD),采用非参数检验(Mann-Whitney *U* test)分析各组积分吸光度值差异。采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

OLP 组和 OLTR 组中,均可观察到类似于淋巴滤泡的 TLS 样结构,而对照组中因缺少炎症细胞浸润,因而不存在类似结构。这些结构在形态上具备 TLS 的基本特点,在 OLP 和 OLTR 损害组织中表现为成簇或成团状聚集的炎症细胞集落(cluster),分布于固有层炎症细胞浸润带中,边界比较清楚,一般呈类圆形。这些 TLS 样结构与二级淋巴器官中的初级淋巴滤泡的形态学表现相似,偶可见类似于次级淋巴滤泡的结构(图 1,以下分别简称为初级 TLS 样结构和次级 TLS 样结构)。

H-E 染色下,OLP 组中出现 TLS 样结构的病例比例(46.7%)高于 OLTR 组(23.4%),但 2 组之间的差异无统计学意义(Fisher 确切概率检验, $P > 0.05$),

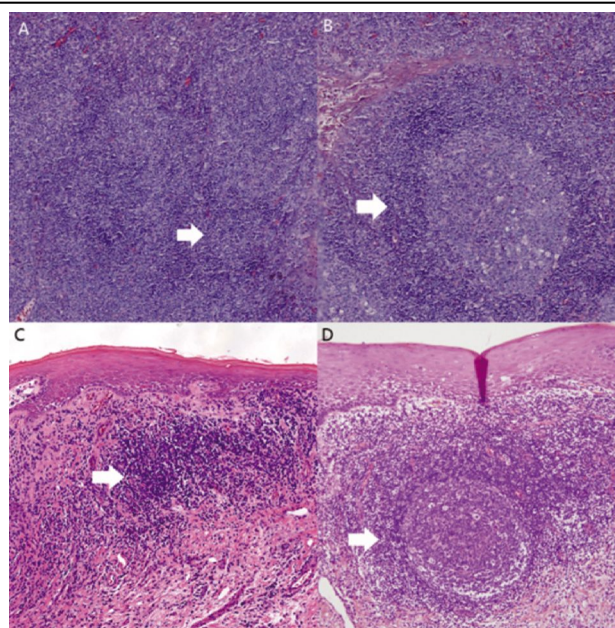


图 1 扁桃体淋巴滤泡和口腔苔藓样损害中的三级淋巴结构(H-E, ×100)。A、B. 扁桃体中的初级和次级淋巴滤泡;C、D. OLL 中的 TLS 样结构(箭头所示)

Figure 1 Lymphatic follicles in tonsil and tertiary lymphoid structure-like tissues in oral lichenoid lesion (H-E, ×100). A, B. Primary and secondary lymphatic follicles in tonsil; C, D. Tertiary lymphoid structure-like tissues in oral lichenoid lesion (white arrows)

详见表 2。

进一步使用 TLS 相关分子标志物(表 1)的免疫组织化学染色,评价 OLL 中 TLS 样结构的细胞组成。结果显示,在正常组织中,除 CD34 外,其他分子标志物阳性表达极少。如图 2 所示,CD3⁺ 细胞广泛分布于 OLL 损害上皮固有层的淋巴细胞浸润带,在 TLS 样结构中主要呈弥漫性分布,与淋巴滤泡中的分布形态有所不同。经 IOD 分析,CD3⁺ 细胞在 OLP(平均 IOD=10 263±11 088,中位数 7 312)中,较 OLTR(平均 IOD=6 213±5 156,中位数 4 968)中略高,但 2 组之间无显著差异($P < 0.05$)。

表 2 OLP 组和 OLTR 组中出现 TLS 样结构的比例

Table 2 Proportion of lymphatic follicle-like structures in OLP group and OLTR group

抗体名称		OLP(n/%)	OLTR(n/%)
N/A(H-E 染色)	无	16/53.3	23/76.7
	有	14/46.7	7/23.4
Bcl-6	无	11/36.7	12/40.0
	有	19/63.3	18/60.0
CD3	无	6/20.0	16/53.4
	有	24/80.0	14/46.7
CD19	无	10/33.3	16/53.4
	有	20/66.7	14/46.7
CD20	无	11/36.7	14/46.7
	有	19/63.4	16/53.4
CD21	无	12/40.0	14/46.7
	有	18/60.0	16/53.3
CD34	无	11/36.7	13/43.3
	有	19/63.3	17/56.7
PNAd	无	11/36.7	19/63.3
	有	19/63.3	11/36.7
Gp36(Podoplanin)	无	12/40.0	18/60.0
	有	18/60.0	12/40.0

注:以 H-E 染色或 TLS 相关分子标志物鉴定 OLL 中的 TLS 样结构,以观察到阳性表达细胞呈簇状或团状分布为标准(即符合 TLS 样结构的形态学表现),评价各组中出现 TLS 样结构的病例数量

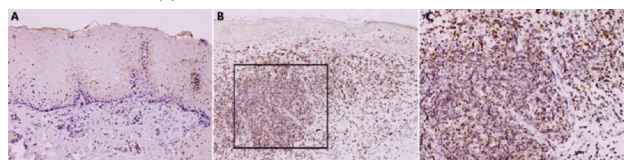


图 2 CD3 在口腔黏膜组织和 OLL 损害中的表达。A. 正常口腔黏膜;B. OLL 损害(框线内为 TLS 样结构,×200);C. OLL 损害中的 TLS 样结构(×400)

Figure 2 CD3 expression in normal oral mucosa and oral lichenoid lesions. A. Normal mucosa (×200); B. Oral lichenoid lesions with a TLS-like structure in the rectangle (×200); C. A TLS-like structure in oral lichenoid lesion(×400)

CD19⁺和 CD20⁺均是 B 淋巴细胞的标志物,阳性表达细胞偶见于正常口腔黏膜,但较广泛分布于 OLL 固有层淋巴细胞浸润带中。其总体分布无明显特征,局部呈灶性分布;但在 TLS 样结构中,并不完全与淋巴滤泡中的分布相同(图 3),在 TLS 样结构的中央少见。CD20 的表达水平在 OLP 组中显著高于 OLTR 组(平均 IOD 13 067±9 049 : 7 695±5 159, $P<0.05$)。

CD21 表达于滤泡树突状细胞(follicular dendritic cells, FDCs)表面, FDCs 在正常口腔黏膜上皮下极为罕见,在 OLL 损害(包括 OLP 和 OLTR)中,主要分布于上皮基底细胞界面,特征性地网状分布于次级 TLS 样结构的中心(类似生发中心的区域,图

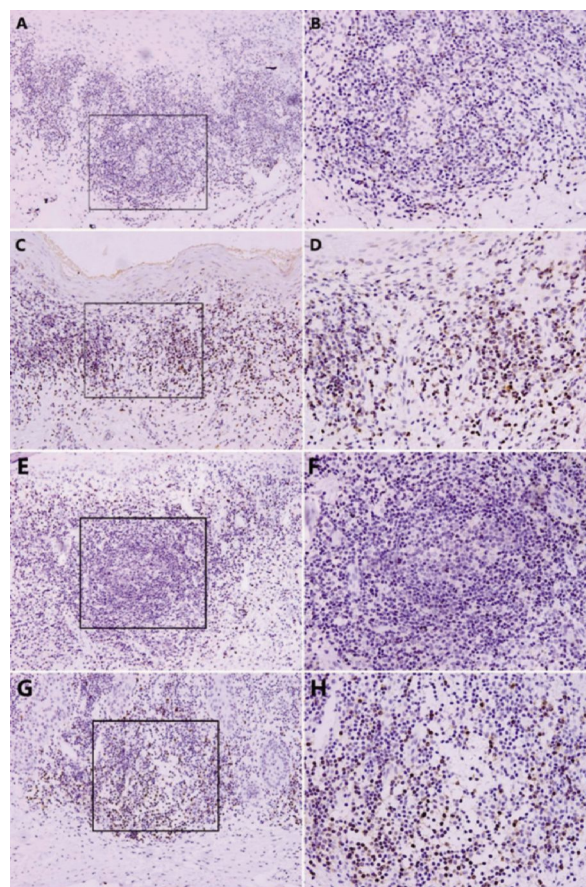


图 3 CD19 和 CD20 在 OLL 中的表达。A-D. CD19; E-H. CD20 (A、B、E、F 为 OLTR, C、D、G、H 为 OLP)

Figure 3 Expression of CD19 and CD20 in OLL. A-D. CD19; E-H. CD20 (A, B, E, F: OLTR; C, D, G, H: OLP)

4C、D), 周围被其他炎症细胞包绕(CD3⁺T 细胞和 CD19⁺、CD20⁺ B 细胞)。IOD 显示, OLP 组中的 CD21⁺ 细胞数量显著高于 OLTR 组(平均 IOD 13968±1456 : 2552±2584, 中位数 9220 : 1311, $P<0.0001$)。

Bcl-6 的表达水平在 OLP 组中明显升高, 阳性表达细胞广泛分布于固有层炎症细胞浸润带中, 但 TLS 样结构的中心区域表达不明显, 提示该类结构中缺乏生发中心类型的组织结构(图 5)。Bcl-6 在 OLP 组中的表达水平(平均 IOD 15498±15108, 中位数 10433)显著高于 OLTR 组(平均 IOD 1841±2276, 中位数 631)和对照组(平均 IOD 819.7±1209, 中位数 447)。

CD34 和 PNAd 组合用以鉴别黏膜中的血管内皮细胞, 而 CD34 和 Gp36 组合用以鉴别淋巴管内皮细胞(图 6)。结果显示, 上述 3 种分子标志物在 OLL 中均高表达(表 3), 但结合阳性细胞的分布位置, 不能依赖于 CD34⁺、PNAd⁺和 CD34⁺、Gp36⁺组合, 有效鉴别 TLS 样结构中的微血管和微淋巴管。

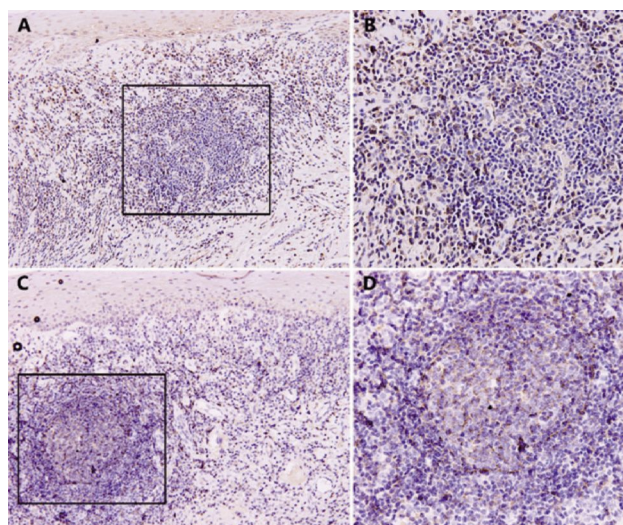


图4 CD21在OLL的TLS中的表达形态。A、B. OLP组;C、D. OLTR组

Figure 4 Morphological pattern of CD21 expression in TLS of oral lichenoid lesions. A, B. Oral lichen planus group; C, D. Oral lichenoid tissue reaction group

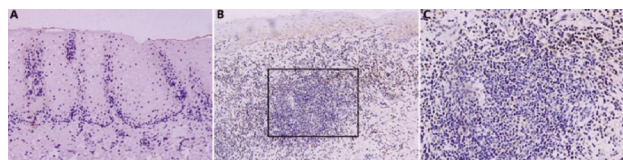


图5 Bcl-6在正常口腔黏膜和OLL损害中的表达。A.正常口腔黏膜;B. OLL损害(框线内为TLS样结构,×200);C. OLL损害中的TLS样结构(×400)

Figure 5 Bcl-6 expression in normal oral mucosa and oral lichenoid lesions. A. Normal oral mucosa (×200); B. Oral lichenoid lesions with a TLS-like structure in the rectangle (×200); C. A TLS-like structure in oral lichenoid lesion(×400)

由于对照组中浸润的炎症细胞数量极少,因此OLP组、OLTR组与对照组相比,各分子标志物均高表达且存在显著差异(图7, $P < 0.05$)。如表2所示,除CD3外,各分子标志物用于鉴定TLS均无统计学差异。与其他标志物相比,CD21能够在组织中较清楚地定位相关细胞的分布位置和组成结构(图4),有助于从形态和细胞类型鉴别OLL中的TLS样结构。

表3 TLS相关分子标志物在正常口腔黏膜、OLP组织、OLTR组织中的表达(IOD)

Table 3 Expression of TLS relevant biomarkers in OLP lesions, OLTR lesions and normal oral mucosa (IOD)

标志物	OLP		OLTR		HC	
	$\bar{x} \pm s$	中位数	$\bar{x} \pm s$	中位数	$\bar{x} \pm s$	中位数
Bcl-6	15 498±15 108	10 433	1 841±2 276	631	819.7±1 209	447.1
CD3	10 263±11 088	7 312	6 213±5 156	4 968	882.3±1 622	105.5
CD19	3 803±3 147	3 146	4 149±3 118	3 960	662.9±814.4	218.7
CD20	13 067±9 049	12 004	7 695±5 159	7 713	1 555.0±1 647	918.5
CD21	13 968±14 560	9 220	2 552±2 584	1 311	538.7±1 146	396.2
CD34	5 103±3 400	4 199	4 609±2 412	4 039	712.5±655.3	556.3
PNAd	10 328±10 383	6 638	1 756±1 570	1 327	702.4±1 048.0	123.8
Podoplanin	12 778±12 390	7 973	2 313±2 578	1 175	688.4±1 216.0	15.48

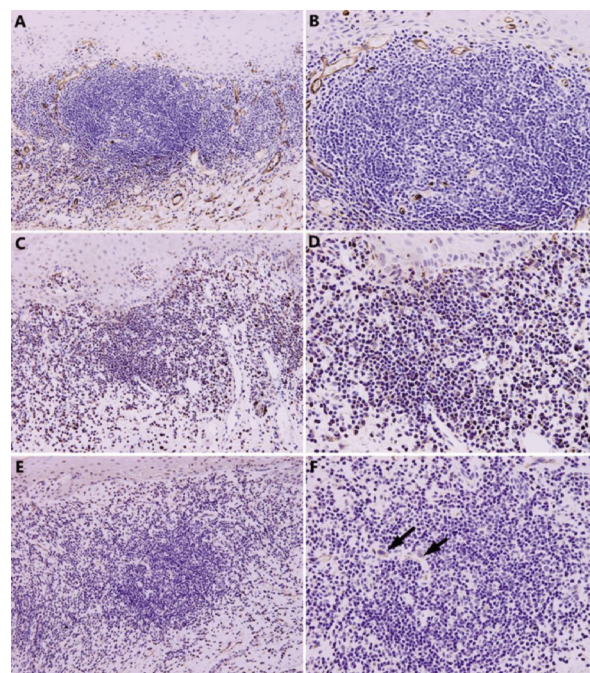


图6 CD34,PNAd和Gp36在OLL组织中的表达。A、B. CD34;C、D. PNAd; E、F. Gp36(A、C、E,×200;B、D、F,×400)

Figure 6 Expression of CD34, PNAd and Gp36 in OLL. A, B. CD34; C, D. PNAd; E, F. Gp36 (A, C, E, ×200; B, D, F, ×400)

3 讨论

本实验结果显示,OLL损害中存在TLS样结构,但典型的TLS(表达上述全部标志物)较少见,且不能作为鉴别OLP和OLTR的特征。已有的研究^[9-10]表明,TLS通常表现为圆形或类圆形炎症细胞簇,中央是网状浸润的FDC和B细胞簇,周围被T细胞、高内皮微静脉和微淋巴管包围。如图1所示,OLL(包括OLP和OLTR)中典型的淋巴滤泡样结构与扁桃体中的初级和次级淋巴滤泡较为相似,形态上呈现为圆形或类圆形炎症细胞集落。部分损害中的淋巴滤泡样结构在形态学上符合TLS的一般表现。

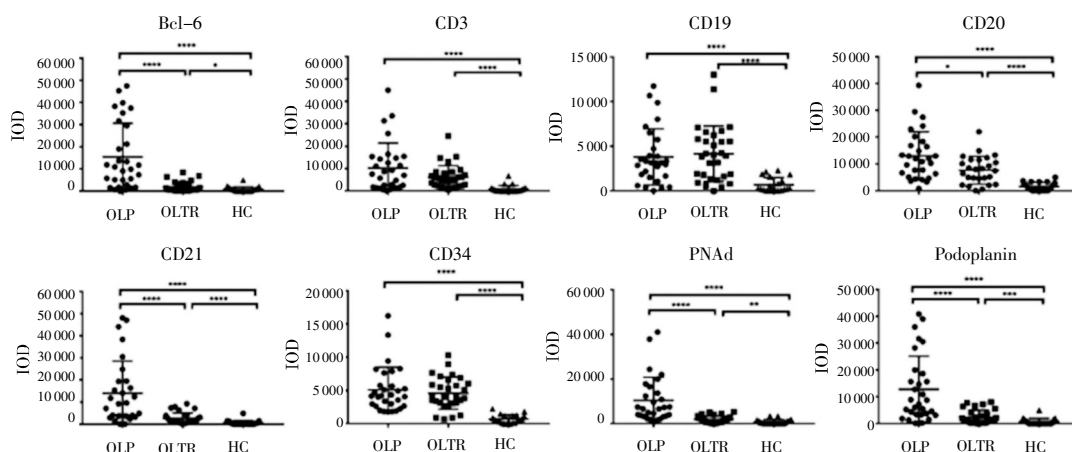


图7 各分子标志物在 OLP 组、OLTR 组和对照组的表达。 $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; $^{****}P<0.0001$

Figure 7 Expression of molecular marker in OLP group, OLTR group and control group. $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; $^{****}P<0.0001$

根据细胞分布的结构和状况, TLS 可分为经典型(classical)和非经典型(non-classical)。经典型 TLS 中, CD21⁺ FDC 组成较为密集的网状结构, 集中浸润在生发中心的 B 细胞簇中; 而非经典型 TLS 中, 生发中心样结构不明显, B 细胞和 FDC 的分布较为稀疏^[1]。 TLS 具有淋巴滤泡的许多特征, 包括 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的区域化、 FDC 网络和生发中心等^[2]。这些特征部分见于 OLL(包括 OLP 和 OLTR) 中的淋巴滤泡样结构中, 在部分次级 TLS 样结构中包含 T 淋巴细胞、 B 淋巴细胞、 FDC 和生发中心样结构, 其中, 以 CD21⁺ FDC 的网状聚集性分布最为明显, 基本符合 TLS 的结构性组成。虽然血管和淋巴管内皮细胞在本实验中未能有效区分, 但本实验发现, CD34⁺ 内皮细胞的分布特点符合 TLS 的特征, 即包绕在 TLS 样结构的周围。因此可以认为, 本实验结果支持 OLL 中存在 TLS 的假设。

在 OLL 的典型和非典型 TLS 中, CD19、 CD20、 CD21 和 CD34 的阳性表达具有较明显的聚集性和结构性特点, 即 B 细胞、 滤泡树突状细胞和内皮细胞在 OLL 的 TLS 中出现频率最高, 且与其在初级或次级淋巴滤泡中的分布位置和分布表现较为一致。其中, 尤以 CD21 的表现更具有特征性, 可作为鉴别是否存在 TLS 的主要标志物。本课题组前期实验也有类似发现, CD11c⁺ 髓样树突状细胞在 OLL 损害中呈现紧贴上皮基底细胞层的带状分布, 在部分固有层淋巴细胞浸润带区域呈局灶性密集浸润的特点^[3]。可以认为, CD21⁺ FDC 和 CD11c⁺ 外周血髓样树突状细胞代表的专职抗原提呈细胞类型(树突状细胞)是 OLL 损害中鉴别 TLS 结构的重要组成性特征。 B 细胞作为另外一种专职抗原提呈细胞, 在 OLL 中的分

布缺乏明确的规律性, 散在分布于炎症细胞浸润带中, 提示该类细胞在 OLL 中可能不以抗原提呈为主要功能。需要指出的是, CD19 作为 B 细胞的标志物, 在 OLL 损害中表达较 CD20 弱, 可能与抗体的克隆来源有关, 也可能与局部浸润的 B 细胞固有的特点有关, 如生发中心 B 细胞表达 CD20, 而边缘区 B 细胞表达 CD19。

CD3、 Be1-6、 PNA1 和 Podoplanin 的阳性表达较弱或较为弥散, 即 T 细胞、 生发中心、 高内皮微静脉和淋巴管内皮细胞的分子标志物表达缺乏特异性, 不能作为淋巴滤泡样结构的标志物, 这一结果与扁桃体中的表现略有不同。

无论以哪种分子标志物标记 TLS 样结构, 后者在 OLP 和 OLTR 损害中均出现, 且出现频率与损害类型无关, 提示损害组织中是否具有 TLS 不能用于鉴别 OLP 和 OLTR, 2 类疾病可能都具有局部免疫诱导自身反应性 T 细胞的能力, 即局部炎症微环境均参与 OLP 和 OLTR 的病理生理过程。

OLL 组织中存在 TLS 样结构, 这一现象提示, OLL 中浸润的自身反应性 T 细胞存在局部免疫诱导机制。外周血中游走的初始 T 淋巴细胞可能在黏膜局部的淋巴滤泡样结构中被诱导分化成自身反应性 T 淋巴细胞。这一结果部分解释了外周血中缺乏自身反应性 T 细胞寡克隆的现象^[4]。这些在局部异位淋巴结构中诱导的自身反应性 T 细胞是否具有一定的寡克隆性, 目前尚不清楚。鉴于口腔是一个开放的复杂环境, 又与系统免疫密切相关, 故可以合理推测, 这些自身反应性 T 细胞可能具有多克隆性。但 TLS 中局部诱导的自身反应性 T 淋巴细胞是否在局部组织中定植, 或移行到局部区域的回流淋巴

结中定植,发展成记忆性 T 淋巴细胞,有待于进一步研究。

本研究的不足之处是对 OLL 损害中 TLS 样结构的功能和形成机制未做研究,也不清楚淋巴细胞对哪些抗原靶标起反应以及自身抗原是否在 TLS 中发挥作用。TLS 样结构的发展机制以及在免疫调节中的作用,有待进一步探讨^[4]。

综上所述,OLL 损害中存在 TLS,以非典型 TLS 为主;CD21 和 CD11c 可作为鉴定 OLL 损害组织中 TLS 的标志物。在 OLL 损害局部,可能存在诱导自身反应性 T 细胞的病理生理机制。明确 OLL 中淋巴滤泡样结构的功能和作用,可能有助于指导对疾病干预策略的选择(局部为主还是全身为主)。

利益冲突声明:无。

作者贡献声明:李晶晶负责实验实施、数据统计分析和论文撰写;宋晨成给予实验技术指导;李晨曦辅助完成图像采集;夏荣辉负责组织样本制备和 H-E 染色;邓一文进行样本采集;王宇峰、唐国瑶负责实验设计与论文指导。

[参考文献]

- [1] 黄小瑾,张招娣,李佳霖,等. 中医药内外兼治对 125 例湿热蕴脾口腔扁平苔藓患者临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(2): 411-414.
- [2] Müller S. Oral lichenoid lesions: distinguishing the benign from the deadly [J]. *Modern Pathol*, 2017, 30(s1): S54-67.
- [3] 于世凤. 口腔组织病理学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 234-235.
- [4] 姚辉,李慧源,周永梅,等. 口腔扁平苔藓 T 细胞受体 BV 基因的优势取用初探 [J]. 上海口腔医学, 2011, 20(1): 76-79.
- [5] Lucchesi D, Pitzalis C, Bombardieri M. EBV and other viruses as triggers of tertiary lymphoid structures in primary Sjögren's syndrome [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2014, 10(4): 445-455.
- [6] van de Pavert, Mebius RE, et al. New insights into the development of lymphoid tissues [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(9): 664-674.
- [7] Neyt K, Perros F, van Geurts Kessel CH, et al. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity [J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(6): 297-305.
- [8] Cupedo T, Jansen W, Kraal G, et al. Induction of secondary and tertiary lymphoid structures in the skin[J]. *Immunity*, 2004, 21(5): 655-667.
- [9] Astorri E, Scrivo R, Bombardieri M, et al. CX3CL1 and CX3CR1 expression in tertiary lymphoid structures in salivary gland infiltrates: fractalkine contribution to lymphoid neogenesis in Sjögren's syndrome[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2014, 53(4): 611-620.
- [10] Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjögren's syndrome [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(8): 1363-1368.
- [11] Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, et al. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(7): 447-462.
- [12] 王燕娟,沈玉娟,徐徐信,等. 免疫组化法观察日本血吸虫感染破坏小鼠脾脏淋巴滤泡结构[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2017, 29(4): 468-470.
- [13] Wang Y, Shang S, Sun Q, et al. Increased infiltration of CD11c⁺/CD123⁺ dendritic cell subsets and upregulation of TLR/IFN- α signaling participate in pathogenesis of oral lichen planus [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 125(5): 459-467.
- [14] Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(36): 4550-4559.

本刊对文稿附图的要求

作者投稿时,图片必须有良好的清晰度和对比度。图中的符号(包括箭头)必须标注。病理照片务必注明染色方法和放大倍数,大体标本照片应有尺度标记。若用人像,应征得患者的书面同意,除非遮盖双眼。图片分辨率不低于 350 dpi(像素/英寸),线条图应用制图软件绘制。每幅图均应冠有图题及中英文说明,若图中使用缩写,请注释其中、英文全称。图号应按其在正文中出现的顺序连续编码。