

类风湿性关节炎滑膜淋巴细胞 CD20、CD45RO 的表达及意义

卢艳东 王瑞琳 刘娟 赵莉莉 王艳霞 徐瑾 熊光宜

作者单位: 300070 天津市, 天津医科大学 天津医院(卢艳东 王艳霞)

300211 天津市, 天津医院病理科(王瑞琳 徐瑾 熊光宜)

300400 天津市, 北辰医院病理科(刘娟)

100070 北京市, 北京丰台医院病理科(赵莉莉)

通讯作者: 王瑞琳, E-mail: wangruilin66@hotmail.com

【摘要】 目的 检测类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者滑膜组织中淋巴细胞 CD20、CD45RO 的表达及分布状况, 探讨其在 RA 发病中的作用。方法 采用免疫组织化学 SP 法检测 65 例 RA 患者和 10 例骨性关节炎(osteoarthritis, OA)患者滑膜组织淋巴细胞 CD20、CD45RO 的表达状况。结果 CD20 阳性淋巴细胞在 RA 组(33.7±6.7)中水平显著高于 OA 组(3.4±1.8), 差异具有统计学意义($t=29.736, P<0.01$)。CD45RO 阳性淋巴细胞在 RA 组(38.2±11.5)中水平显著高于 OA 组(9.1±2.7), 差异具有统计学意义($t=17.535, P<0.01$)。在 RA 病例中, 滑膜下组织中 CD20 阳性淋巴细胞多灶性聚集, CD45RO 阳性细胞灶性或弥漫分布, 滑膜下组织 CD20 阳性淋巴细胞水平低于 CD45RO 阳性淋巴细胞, 差异具有统计学意义($t=-2.732, P<0.01$)。CD45RO 与 CD20 表达无相关性($r=0.024, P>0.05$)。结论 CD20、CD45RO 阳性淋巴细胞在 RA 滑膜组织中均明显增多, B、T 淋巴细胞在 RA 的发病、发展中起重要作用。

【关键词】 关节炎, 类风湿; CD20; CD45RO; 免疫组织化学; 细胞因子

Expression of CD20 and CD45RO and their biological significance in rheumatoid arthritis synovium

LU Yan-dong¹, WANG Rui-lin², LIU Juan³, et al. ¹Tianjin Medical University, Tianjin Hospital, Tianjin 300070, China ²Department of Pathology, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China ³Department of Pathology, Beichen Hospital, Tianjin 300400, China

【Abstract】 **Objective** To detect the expression and distribution of CD20 and CD45RO in synovium tissue of rheumatoid arthritis (RA) and discuss their roles in the mechanism of RA. **Methods** SP immunohistochemical method was used to detect the expressions of CD20 and CD45RO in synovium of 65 RA cases and 10 osteoarthritis(OA) cases. **Results** The level of CD20 positive lymphocytes(33.7±6.7) in RA was higher than that in OA (3.4±1.8) and the difference had statistical significance ($t=29.736, P<0.01$). The level of CD45RO positive lymphocytes(38.2±11.5) in RA was higher than that in OA cases(9.1±2.7) and the difference had statistical significance($t=17.535, P<0.01$). The level of CD20 positive lymphocytes was lower than CD45RO positive lymphocytes in RA, the difference had statistical significance ($t=-2.732, P<0.01$). CD20 positive lymphocytes in the subsynovial tissue of RA are multifocal aggregated while CD45RO lymphocytes were focally aggregated or diffusely distributed. The expression of CD20 and CD45RO had no relationship($r=0.024, P>0.05$). **Conclusion** The expression of CD20 and CD45RO lymphocytes are increasing in the RA synovium. Thereby, it proves that both B and T lymphocytes play important roles in the pathogenesis of RA.

【Key words】 Arthritis, rheumatoid; CD20; CD45RO; Immunohistochemistry; Cytokine

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节滑膜炎为病理特征,以对称性、进行性及侵蚀性的多关节炎为主要临床表现的慢性全身性自身免疫性疾病。晚期由于关节软骨和骨的破坏而导致关节畸形和功能障碍。RA 是关节炎中致残率最高的

疾病,发病机制比较复杂,有多种免疫细胞和细胞因子的参与,至今原因未明。其中,炎症是 RA 发病的关键因素^[1,2]。

B 和 T 淋巴细胞是 RA 炎症病变中的基本细胞成分^[3]。最初认为 T 淋巴细胞在 RA 的发病中起着重

要作用。T淋巴细胞与抗原肽结合后,通过T细胞受体诱导,从而激活了效应性T细胞而导致一些表面分子、炎症因子和细胞因子的表达和释放,如CD69、肿瘤坏死因子 α 、细胞核因子受体活化因子配体、IL-2和IL-17等^[4],进而导致RA的发生和发展。然而,长期以来患者体内存在异常活性的B细胞和高表达的自身抗体谱,证明B细胞同样参与了RA的自身免疫过程^[5]。最近,用抗CD20单克隆抗体利妥昔单抗治疗RA取得的临床治疗效果更证实了这一点^[6]。

本文采用免疫组织化学方法,检测滑膜组织中CD20、CD45RO阳性淋巴细胞的表达及分布状况,探讨其在RA发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集天津市天津医院2004年1月至2006年10月经病理学确诊的RA患者手术切除滑膜组织标本65例。其中女性患者43例,男性22例,年龄12~71岁。发病部位:膝关节51例,髋关节4例,肘关节3例,踝关节5例,腕关节2例。另外选取10例骨性关节炎(osteoarthritis, OA)患者滑膜组织,年龄11~35岁,做为对照组。

1.2 试剂及实验方法 CD20鼠抗人单克隆抗体(ZM-0039,工作液)、CD45RO鼠抗人单克隆抗体(ZM-0055,工作液)、SP-9000试剂盒、DAB显色试剂盒(ZLI-9032),上述试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。切片脱蜡,水化,微波修复,采用免疫组化SP法,DAB显色。用PBS做阴性对照。

1.3 结果判断 CD20、CD45RO的阳性产物呈棕色细颗粒状,主要定位于淋巴细胞的细胞膜,少许细胞浆中亦可见表达。每例随机选取10个高倍视野,计数每个视野网格测微尺内阳性细胞个数,10个视野阳性细胞总数/10得出每例阳性细胞均数。

1.4 统计学处理 采用SPSS 11.5统计软件进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据比较用配对或独立样本t检验,CD20、CD45RO的相关性分析采用Pearson相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 滑膜组织中淋巴细胞的分布状况 所有RA患者的滑膜组织中均显示中等量或大量淋巴细胞浸润,93.8%(61/65)病例出现淋巴细胞灶性聚集,甚至出现生发中心,形成淋巴滤泡样结构。聚集的淋巴细胞中以CD20(+)淋巴细胞为主。在灶性聚集的淋巴细胞周围,有数量多少不等的浆细胞,有的呈大片分布,局灶出现卢梭小体(见图1、2)。而在OA病例

中,淋巴细胞数量很少,散在或围绕血管分布。

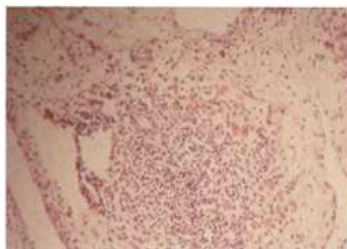


图1 RA滑膜乳头状增生,滑膜下组织中淋巴细胞增生,呈灶性聚集(100x, HE)

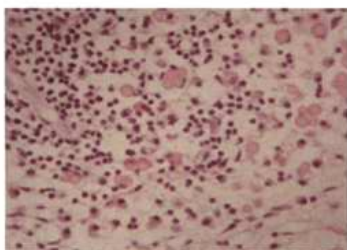


图2 RA滑膜下组织中增生的淋巴细胞周围散在大量浆细胞及卢梭小体(400x, HE)

2.1.1 滑膜下组织中CD20(+)淋巴细胞在RA组中数量显著高于OA组(见图3、4),差异具有统计学意义($P < 0.01$),见表1。

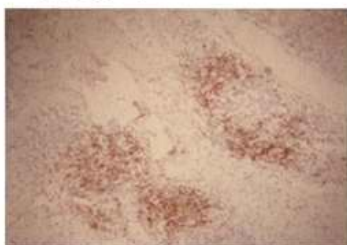


图3 RA滑膜组织灶性增生的淋巴组织中CD20阳性细胞(100x, SP法)

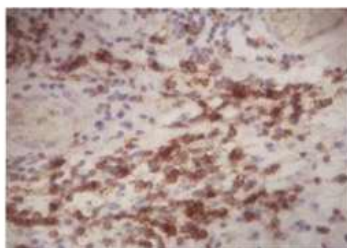


图4 RA滑膜组织灶性增生的淋巴组织中CD20阳性细胞(400x, SP法)

2.1.2 滑膜下组织中CD45RO(+)淋巴细胞在RA组中表达数量显著高于OA组(见图5、6、7),差异具有统计学意义($P < 0.01$),见表2。

2.1.3 滑膜下组织中CD45RO(+)淋巴细胞在RA

表1 RA组和OA组滑膜下组织中CD20(+)淋巴细胞数量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CD20(+)	t值	P值
RA组	65	33.7±6.7	29.736	< 0.01
OA组	10	3.4±1.8		

表2 RA组和OA组滑膜下组织中CD45RO(+)淋巴细胞数量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CD45RO	t值	P值
RA组	65	38.2±11.5	17.535	< 0.01
OA组	10	9.1±2.7		

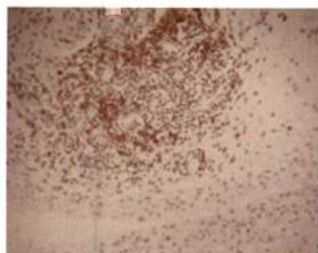


图5 RA滑膜组织灶性增生的淋巴组织中CD45RO阳性淋巴细胞(200x, SP法)

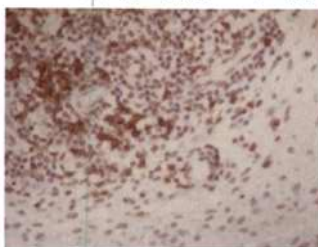


图6 RA滑膜组织灶性增生的淋巴组织中CD45RO阳性淋巴细胞(400x, SP法)

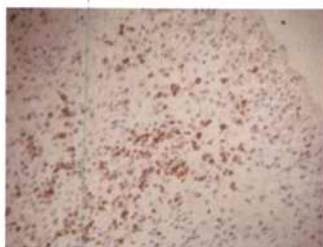


图7 RA滑膜被覆细胞及滑膜下组织中弥漫散在CD45RO阳性淋巴细胞(200x, SP法)

患者中的数量较CD20(+)淋巴细胞多,差异具有统计学意义($P < 0.01$),CD45RO(+)/CD20(+)约为1.1:1。CD45RO与CD20表达无相关性($r = 0.024, P > 0.05$),见表3。

2.2 滑膜被覆细胞中淋巴细胞的分布情况 在RA

表3 CD20(+),CD45RO(+)淋巴细胞在RA组滑膜下组织中数量比较

组别	例数	$\bar{x}\pm s$	t值	P值
CD20(+)	65	33.7±6.7	-2.732	< 0.01
CD45RO(+)	65	38.2±11.5		

组患者中,86.2%(56/65)滑膜被覆细胞中有少量淋巴细胞浸润,其中大部分72.3%(47/65)为CD45RO(+)淋巴细胞(见图8),13.8%(9/65)中既有CD45RO(+)淋巴细胞,又有CD20(+)淋巴细胞,位于滑膜被覆细胞之间;而在10例OA病例中,仅有1例有少量CD45RO(+)淋巴细胞浸润。

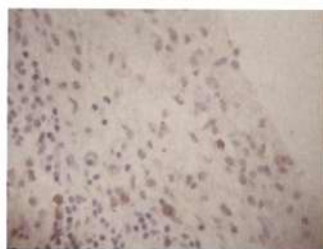


图8 RA滑膜被覆细胞中和滑膜下组织散在少量CD45RO阳性淋巴细胞(400x, SP法)

3 讨论

RA的病因及发病机制尚不完全清楚。RA的发生是具有遗传倾向的个体,在众多外因作用下,引发体内的免疫学异常,进而诱导RA慢性炎症的产生,出现RA的基本病理学改变滑膜增生,纤维蛋白沉积,大量炎性细胞浸润,最终导致关节软骨、骨和韧带等关节结构的破坏。免疫学异常、炎症及其细胞因子^[7]等在RA的发病、发展过程中起着重要作用。

3.1 CD20淋巴细胞与RA CD20是参与B淋巴细胞识别抗原活化的主要CD分子,属跨膜糖蛋白,表达于早期B淋巴细胞和成熟B淋巴细胞阶段,分化为浆细胞后表达消失。B淋巴细胞参与RA的发病机制早在发现类风湿因子(rheumatoid factor, RF)与类风湿相关时即被提出。B淋巴细胞有多种作用:它们可以作为抗原提呈细胞,分泌前炎症因子和细胞因子,产生RF和其它自身抗体等。B淋巴细胞将处理过的抗原提呈给T淋巴细胞,促进其活化、增殖,从而发挥前炎症介质的作用^[8]。Takemura等^[9]发现RA患者关节滑膜中自身反应性T细胞持续活化是依赖于B细胞的存在。

本文研究发现,CD20的表达主要定位于滑膜组织中淋巴细胞的胞膜。RA组患者的滑膜下组织中聚集的淋巴细胞以及生发中心结构中以CD20(+)

淋巴细胞为主,滑膜被覆细胞中仅有极少量 CD20 (+) 细胞出现。RA 组 CD20 (+) 淋巴细胞数量显著高于其在 OA 组,提示其在 RA 的发病中有重要作用。一项应用滑膜-重度免疫缺陷小鼠嵌合体模型的研究发现,B 细胞对于生发中心的形成和滤泡辅助 T 细胞的聚集有重要作用^[9]。而且,通过对 RA 的动物模型研究显示,活化的 B 细胞通过 Toll 样受体在 RA 中发挥前炎症介质的作用^[10]。目前,应用 CD20 的单克隆抗体利妥昔单抗来治疗难治性 RA 患者,具有明显的疗效和较少的不良反应,更证实了 CD20 (+) 淋巴细胞在 RA 中起着重要作用。

3.2 CD45RO 淋巴细胞与 RA CD45RO 抗原是白 细胞共同抗原的一类亚型,由 CD45 肽链胞外区氨基基端的 3 个外显子发生旁路剪接而生成,通常表达于记忆性 T 淋巴细胞,记忆性 T 辅助细胞在抗原刺激下,产生细胞因子等效应因子,辅助 B 细胞产生抗体。张军等^[11] 研究表明 RA 患者关节液中的 CD45RO (+) 淋巴细胞百分比高于正常人外周血,而 RA 患者外周血 CD45RO (+) 淋巴细胞百分比高于正常人外周血,CD45RO (+) 淋巴细胞是参与 RA 病理过程的主要淋巴细胞。

本文研究发现,CD45RO 的表达主要定位于滑膜组织中淋巴细胞的胞膜,胞浆中亦有少量表达。RA 组患者的滑膜下组织中 CD45RO (+) 淋巴细胞呈灶性或弥漫分布,或聚集在生发中心周边。RA 组 CD45RO (+) 淋巴细胞数量显著高于 OA 病例组,差异具有统计学意义。同时,本文研究还发现,大部分滑膜被覆细胞中有 CD45RO (+) 淋巴细胞表达,推测其可能与滑膜损伤、增生有关。Tran 等^[12] 研究显示 T 细胞和滑膜细胞可维持相互的前炎症活性。

Capitanescu 等^[13] 通过对早期滑膜组织中淋巴细胞 CD20、CD45RO 的表达情况发现,T 淋巴细胞在 RA 的滑膜组织中占优势,B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的比率为 1:1.6~1:2。本研究表明 RA 组 CD45RO (+) 淋巴细胞数量高于 CD20 (+) 淋巴细胞,大致比率为 1.1:1,分析其原因可能在 RA 晚期,辅助 T 细胞表达失调,导致 B 淋巴细胞在滑膜组织中异常克隆所致。

T 淋巴细胞在 RA 中的作用机制研究较为清楚。T 淋巴细胞被 B 淋巴细胞活化,分泌 IL-2,引起 T 淋巴细胞克隆。活化后的 T 淋巴细胞表达 CD69、RANKL、TNF- α , 分别参与巨噬细胞、滑膜成纤维细胞和破骨细胞的活化。随后,T 淋巴细胞分泌可溶性 IL-17、IFN- γ 等一系列细胞因子,刺激滑膜细胞产

生炎症,引起基质金属蛋白酶^[14] 的释放、结缔组织降解和血管翳的形成,最终导致关节软骨和骨破坏,导致关节畸形。

3.3 浆细胞与 RA 本文研究还发现,在灶性聚集的淋巴细胞周围,有浆细胞分布,有的呈大片分布,局灶出现卢梭小体。卢梭小体是免疫球蛋白在浆细胞中沉积,继而发生玻璃变性的结果。它的出现提示滑膜组织中浆细胞产生过多的自身抗体,这些抗体可以和关节局部抗原结合形成免疫复合物,继而活化补体,导致关节损伤。

3.4 展望 本文通过对 RA 组滑膜组织中 CD20、CD45RO 研究发现,B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞均参与了 RA 的发生、发展,同时也为 RA 的靶向治疗提供了组织学依据。

4 参考文献

- 1 Panayi GS, Corrigan VM, Pitzalis C. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: The role of T cells and other beasts. *Rheum Dis Clin North Am*, 2001, 27: 317-334.
- 2 Kim HJ, Berek C. B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2002, 2: 126-131.
- 3 Zhang Z, Bridges SL JR. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: Role of B lymphocytes. *Rheum Dis Clin North Am*, 2001, 7: 335-353.
- 4 Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 2001, 344: 907-916.
- 5 钱柳, 陆梅生, 张冬青. 类风湿性关节炎与自身反应性 B 细胞. *中国免疫学杂志*, 2009, 25: 1133-1140.
- 6 Acobi AM, Darner T. Current aspects of anti-CD20 therapy in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10: 316-321.
- 7 Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*, 2008, 118, 3537-3545.
- 8 Panayi GS. B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 2: ii3-ii7.
- 9 Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, et al. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol*, 2001, 167: 4710-4718.
- 10 Martinez-Gamboa L, Brezinschek HP, Burmester GR, et al. Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy. *Autoimmun Rev*, 2006, 5: 437-442.
- 11 张军, 张薇薇, 方超平, 等. 类风湿性关节炎患者淋巴细胞 CD45RO、CD45RA 的表达及临床意义. *检验医学*, 2007, 22: 235-238.
- 12 Tran CN, Lundy SK, Fox DA. Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*, 2005, 12: 183-189.
- 13 Capitanescu B, Simionescu C, Stepan A, et al. (下接第 49 页)

- 1432-1436.
- 26 Eggers KM, Lagerqvist B, Venge P, et al. Persistent cardiac troponin I elevation in stabilized patients after an episode of acute coronary syndrome predicts long-term mortality. *Circulation*, 2007, 116:1907-1914.
- 27 Heesch C, Hamm CW, Bruemmer J, et al. Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. CAPTURE Investigators. Chimeric c7E3 AntiPlatelet Therapy in Unstable angina REfractory to standard treatment trial. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 35:1535-1542.
- 28 Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, et al. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*, 2000, 343:1139-1147.
- 29 Scirica BM. Acute coronary syndrome: emerging tools for diagnosis and risk assessment. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55: 1403-1415.
- 30 Eggers KM, Jaffe AS, Lind L, et al. Value of cardiac troponin I cutoff concentrations below the 99th percentile for clinical decision-making. *Clin Chem*, 2009, 55:85-92.
- 31 Eggers KM, Lind L, Ahlstrom H, et al. Prevalence and pathophysiological mechanisms of elevated cardiac troponin I levels in a population-based sample of elderly subjects. *Eur Heart J*, 2008, 29:2252-2258.
- 32 Apple FS, Murakami MM, Pearce LA, et al. Predictive value of cardiac troponin I and T for subsequent death in end-stage renal disease. *Circulation*, 2002, 106:2941-2945.
- 33 Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ*, 2005, 173:1191-1202.

(收稿日期:2010-01-25)

(本文编辑:李蕊)

2010 年全国细菌耐药专题学术会议

尊敬的各位同仁:

抗菌药物是我国临床应用最为广泛的一类药物,合理使用可以治疗疾病,为人类健康事业服务,不合理使用,尤其是抗菌药物滥用将导致大量与药物相关的不良反应发生,产生药源性疾病,威胁患者生命安全,同时还将导致细菌产生耐药性和耐药菌感染流行的严重后果,使临床治疗更为困难。

为了延缓细菌耐药的产生,指导抗生素的合理应用,北京大学临床药理研究所定于 2010 年 6 月 11-12 日在北京唯实国际交流中心举办 2010 年全国细菌耐药专题学术会议,同时举办每年一届的卫生部细菌监测网工作会议,将邀请著名专家和学者做精彩的报告,就细菌耐药基础与临床研究进行深入探讨和交流,细菌耐药监测网工作会议上将对 2009 年的细菌耐药监测结果进行总结,并部署 2010 年度细菌耐药监测工作。

届时将有来自全国 31 个省、市、自治区中 148 家细菌耐

药监测网的成员单位的耐药监测项目负责人参加此次会议,更有呼吸、重症医学、感染科等相关临床人员与会,预计参会人数约 350 人。

本次会议不仅是一场盛大的细菌耐药监测与临床专题学术会议,也给基础研究工作者与临床人员提供了一个良好的沟通平台,大会组委会欢迎致力于基础研究、临床等相关人员踊跃参加本次会议。

举办地点:北京唯实国际交流中心

联系人:罗福银

会议日期:2010-6-11 至 2010-6-12

电话:010-88597680

传真:010-88597578

E-mail:zsqsq@bjxie.com

(上接第 28 页)

CD20cy and CD45RO immunexpression in early rheumatoid arthritis synovium. *Rom J Morphol Embryol*, 2010, 51:49-54.

14 赵莉莉,王瑞琳,魏典,等. MMP-9 和 TIMP-1 在类风湿性关节炎发病机制中作用的探讨. *实用检验医师杂志*, 2009, 1:16-20.

(收稿日期:2010-02-24)

(本文编辑:杨军)