

Reis-Bücklers 角膜营养不良的组织病理学研究

付梦军¹, 张浩润¹, 陈丽静²

作者单位:¹(261000) 中国山东省潍坊市, 潍坊眼科医院;
²(272000) 中国山东省济宁市第一人民医院眼科
作者简介:付梦军, 毕业于滨州医学院, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼视光学、眼屈光手术。
通讯作者:张浩润, 毕业于潍坊医学院, 主任医师, 研究方向: 眼视光学、眼屈光手术、白内障、角膜病。Zhrun2516@sina.com
收稿日期: 2017-02-27 修回日期: 2017-08-28

Histopathologic changes of Reis-Bücklers corneal dystrophy

Meng-Jun Fu¹, Hao-Run Zhang¹, Li-Jing Chen²

¹Weifang Eye Hospital, Weifang 261000, Shandong Province, China; ²Department of Ophthalmology, Jining No. 1 People's Hospital, Jining 272000, Shandong Province, China

Correspondence to: Hao-Run Zhang. Weifang Eye Hospital, Weifang 261000, Shandong Province, China. Zhrun2516@sina.com

Received: 2017-02-27 Accepted: 2017-08-28

Abstract

• AIM: To explore the histopathologic changes of Reis-Bücklers corneal dystrophy (RBCD).

• METHODS: Cornea buttons were obtained from patients in 1 pedigree who underwent lamella keratoplasty. Sections with HE and special staining which included symplectic blue staining and Masson staining and Congo red staining were observed under light microscope. Two normal cornea specimens (donated corneas from eye bank) were used as control.

• RESULTS: In those patients, the bowman's membrane disappeared. The main lesion was in bowman's membrane through HE staining, positive through PAS Congo red staining and Masson staining, negative through symplectic blue staining.

• CONCLUSION: The Reis-Bücklers corneal dystrophy is characterized as geographic map-like lesion of bowman's membrane, and the abnormal extracellular deposit is amyloid protein fiber.

• KEYWORDS: Reis-Bücklers corneal dystrophy; genetic; pathology; corneal transplantation

Citation: Fu MJ, Zhang HR, Chen LJ. Histopathologic changes of Reis-Bücklers corneal dystrophy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(10):1932-1935

摘要

目的: 探讨 Reis-Bücklers 角膜营养不良的组织病理学改变。

方法: 取 1 家系中 3 例 3 眼 Reis-Bücklers 角膜营养不良患者角膜移植术后的病变角膜, 3 眼的 1/2 角膜组织行 HE、PAS、刚果红、Masson、阿辛蓝染色后光学显微镜观察。以 2 例 2 眼正常角膜组织(眼库捐献角膜)作为对照。

结果: Reis-Bücklers 角膜营养不良患者前弹力层消失, 被异常组织代替。HE 染色证实病变主要累及角膜前弹力层, PAS、刚果红、Masson 染色均为阳性, 阿辛蓝染色为阴性。

结论: 该 Reis-Bücklers 角膜营养不良家系为前弹力层地图型病变, 角膜异常沉着物性质为细胞外淀粉样纤维蛋白沉着。

关键词: Reis-Bücklers 角膜营养不良; 遗传性; 病理学; 角膜移植

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.10.34

引用: 付梦军, 张浩润, 陈丽静. Reis-Bücklers 角膜营养不良的组织病理学研究. 国际眼科杂志 2017;17(10):1932-1935

0 引言

Reis-Bücklers 角膜营养不良 (Reis-Bücklers corneal dystrophy, RBCD) 是一种较罕见的常染色体显性遗传病。1917 年首先被 Reis 报道, 1949 年又被 Bücklers 加以详细地描述^[1-2]。其临床特点是幼年发病, 反复发作的角膜上皮糜烂, 位于前弹力层的角膜逐渐融合、扩大, 进行性视力下降。裂隙灯显微镜检查可见角膜浅表呈地图样或蜂窝样灰白色混浊, 中央角膜受损最重。本研究中我们报道了 1 个近亲结婚家系, 共 37 例, 有表现型者共 10 例患者, 对有表现型的 3 例 3 眼板层或穿透性角膜移植术后的病变角膜组织行临床病理检查, 探讨中国 RBCD 患者的角膜组织病理学特征, 为临床提供准确的诊断依据。

1 对象和方法

1.1 对象 经医院医学伦理委员会批准, 征得患者本人及家属同意, 收集 RBCD 的 1 个家系(图 1), 该家系共查到 37 例, 研究对象均为汉族人, 有症状及表型者 10 例 20 眼, 其中男 4 例 8 眼, 女 6 例 12 眼。10 例患者中, 年龄 4~64 岁, 先证者的兄弟姐妹 4 例 8 眼全发病, 其母亲发病。该家系中患者的特点: (1) 患者普遍自 4 岁左右出现反复发作性双眼疼痛和异物感, 伴畏光、流泪、眼红、视物模糊、角膜知觉减退等初发症状, 通常双眼先后发病, 7 岁左右出现视力障碍, 年轻时发作频繁, 中年后发作次数减少。(2) 患者其祖父和祖母为近亲结婚, 有家族遗传病史, 其兄弟姐妹和母亲等家族中 10 例均有类似病史。(3) 家族中有 3 例行双眼角膜移植, 均于 1a 左右复发。(4) 该家系中患病与性别无关, 男女发病无明显差别。(5) 在各代连续传递。以 2 例 2 眼正常角膜组织(眼库捐献角膜)作为对照。

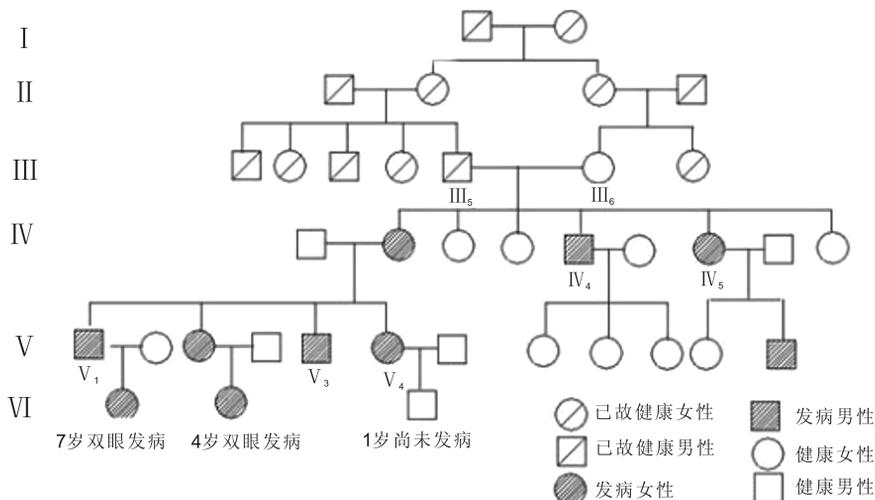


图1 III₅与III₆近亲结婚 IV₅双眼行板层角膜移植术,术后1a复发;IV₄和V₁双眼行深板层角膜移植术,术后1a复发。

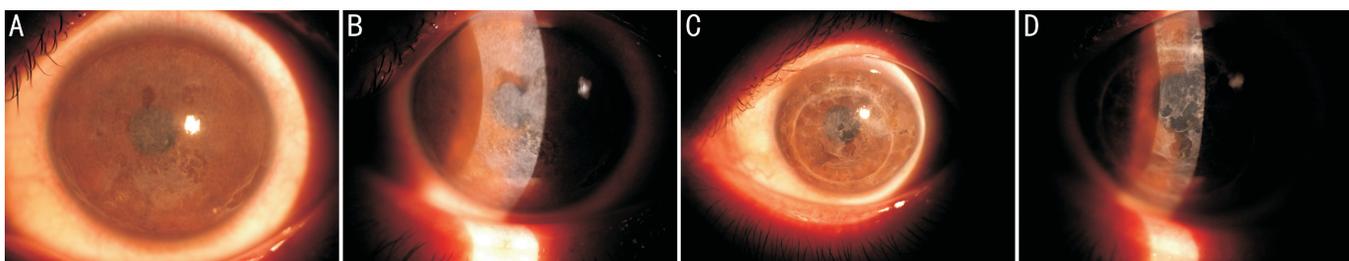


图2 眼前节照相 A:角膜上皮粗糙,角膜上皮和上皮可见大量灰白色混浊;B:裂隙灯下见粗糙的角膜上皮厚薄不均;C:角膜移植术后的角膜营养不良复发,角膜上皮粗糙;D:裂隙灯下见角膜移植术后复发病例,角膜上皮厚薄不均。

1.2 方法

1.2.1 裂隙灯显微镜和眼前节 OCT 观察 裂隙灯检查:将患者下颌托置于下颌托上,调整焦点和光源宽度,取45°斜照法,形成“光学切面”,观察患者病变的角膜组织。眼前节 OCT 观察:将患者下颌托置于下颌托上,对焦,1 310nm近红外光相干干涉快速高分辨率的角膜扫描(10mm宽×3mm深),全角度、非接触地观察角膜瘢痕和不透明角膜。

1.2.2 HE 染色和特殊染色 取材和固定:取3眼的1/2角膜材料后放入固定液中(无水乙醇 60mL、体积分数10%中性甲醛 10mL、冰醋酸 10mL、氯仿 20mL混匀)固定24h,流水冲洗24h后行脱水,石蜡包埋,切片,脱蜡至水。HE染色:将切片放入苏木精水溶液中染色5min,酸水和氨水中分色各8s,流水冲洗1h,入蒸馏水片刻,入700mL/L和900mL/L酒精中脱水各10min,入酒精伊红染色液染色2~3min,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。PAS染色:将切片蒸馏水冲洗,700mL/L酒精洗后放入高碘酸酒精溶液10min,700mL/L酒精洗后入还原液中1min,700mL/L酒精洗后入无色基性品红溶液1h。流水冲洗10min,用苏木素复染细胞核5min,1%盐酸酒精分化,冲洗,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。刚果红染色:将切片放入刚果红染液染15min,入碱性乙醇分化液5s,水洗,苏木素复染2min,水洗,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。Masson染色:将切片入Masson复合染色液5min,0.2%醋酸水溶液稍洗,5%磷钨酸10min,0.2%醋酸水溶液浸洗2次。亮绿染色液5min,0.2%醋酸水溶液洗2次,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。阿辛蓝染色:将切片放入1%阿辛蓝染色

20min,水洗3min,入1%中性红染液复染细胞核3min,水洗3min,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

2 结果

2.1 RBCD家系的裂隙灯显微镜和眼前节 OCT 观察结果

可见角膜上皮粗糙,角膜上皮和上皮可见大量灰白色混浊,角膜上皮厚薄不均(图2A,B);板层角膜移植术后复发患者角膜植片在位,角膜上皮粗糙,角膜上皮和上皮可见灰白色混浊(图2C,D)。眼前节 OCT可见角膜上皮厚薄不均,前弹力层消失,前弹力层被异常物质代替(图3)。

2.2 RBCD家系的HE和特殊染色结果 病变角膜组织HE染色见角膜上皮厚薄不均,细胞排列紊乱,部分细胞肿胀,胞质和胞核浓缩,基底细胞正常的结构消失,前弹力层结构消失,完全被大量异常物质所取代(图4)。PAS染色阳性,见前弹力层被红色物质代替(图5)。刚果红染色阳性,上皮细胞细胞核蓝染,前弹力层被橘红色的物质代替(图6)。Masson染色阳性,前弹力层被红色物质代替,并可见部分红色物质侵入角膜上皮层,基质胶原纤维呈现绿色(图7)。阿辛蓝染色阴性(图8)。

2.3 对照组的HE染色和Masson染色结果 光学显微镜观察,正常角膜组织HE染色见角膜上皮有5~6层细胞,排列规则,前弹力层厚薄均匀一致(图9),基质胶原纤维束排列整齐(图10)。特殊染色未见定形物沉着。

3 讨论

角膜营养不良是临床上比较少见的遗传性眼病,具有特征性的眼部表现,具有双眼对称性,是缓慢进展的遗传性疾病^[3],其发病机制仍不十分明确。按照累及角膜的部分不同可分为:角膜上皮营养不良、前弹力层角膜营养

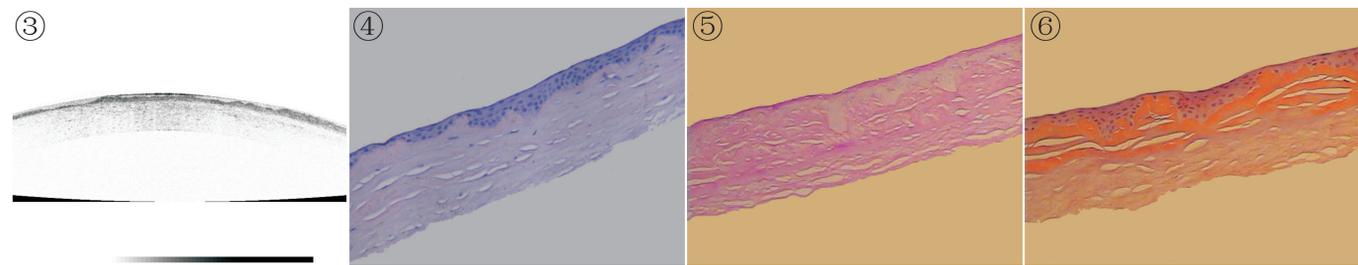


图3 眼前节 OCT 示角膜上皮厚薄不均,前弹力层消失,前弹力层被异常物质代替。
图4 病变角膜组织 HE 染色示角膜上皮厚薄不均,细胞排列紊乱,部分细胞肿胀,胞质和胞核浓缩,基底细胞正常的结构消失,前弹力层结构消失,完全被大量异常物质所取代 (HE×100)。
图5 病变角膜组织 PAS 染色示前弹力层被红色物质代替 (PAS 染色×100)。
图6 病变角膜组织刚果红染色示上皮细胞细胞核蓝染,前弹力层被橘红色的物质代替 (刚果红染色×100)。

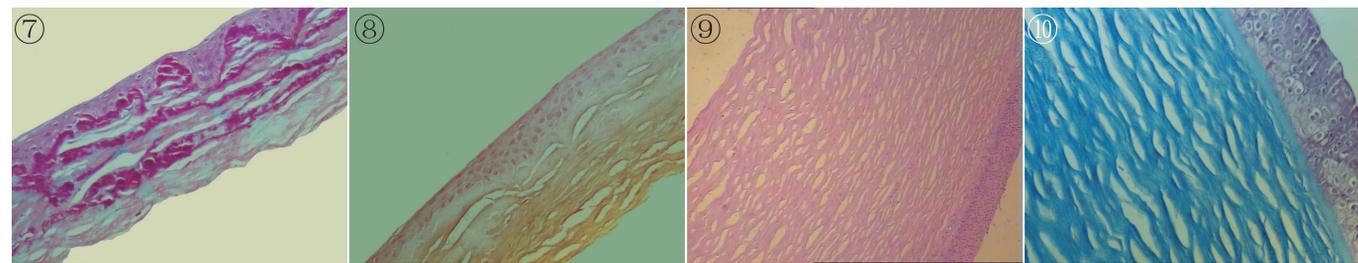


图7 病变角膜组织 Masson 染色示前弹力层被红色物质代替,并可见部分红色物质侵入角膜上皮层,基质胶原纤维呈现绿色 (Masson 染色×100)。
图8 病变角膜组织阿辛蓝染色阴性 (阿辛蓝染色×100)。
图9 正常角膜组织 HE 染色示角膜上皮有 5~6 层细胞,排列规则,前弹力层厚薄均匀一致 (HE×400)。
图10 正常角膜组织 Masson 染色示基质胶原纤维束排列整齐 (Masson 染色×200)。

不良、基质型角膜营养不良、后弹力层角膜营养不良和内皮型角膜营养不良^[4-7]。临床上也可以根据角膜的部位分为:前部角膜营养不良(主要影响上皮层和前弹力层)、基质型角膜营养不良、后部角膜营养不良(主要影响角膜后弹力层和角膜内皮细胞层)^[8-10]。

3.1 前弹力层角膜营养不良的分类 前弹力层角膜营养不良包括 RBCD 和 Thiel-Behnkes 角膜营养不良 (Thiel-Behnkes corneal dystrophy, TBCD)。TBCD 以往被认为是 RBCD II 型, Kuchle 等发现 RBCD 与 TBCD 的临床表现与电镜下的超微表现不同。RBCD 以融合的地图状混浊为主要特征, TBCD 以蜂窝状混浊为主要特征; RBCD 损伤视力更严重, 角膜移植后复发更早, 范围更广, 电镜下 RBCD 前弹力层沉积物为棒状, 而 TBCD 为纤维样物质^[11]。更重要的是, 两者的人类转化生长因子诱导的细胞外基质黏附蛋白 (transforming growth factor b-induced, TGFBI or BIGH3) 基因突变的类型不同, RBCD 是第 4 外显子的 R124L 突变, 而 TBCD 是第 12 外显子的 R555Q 突变^[12]。

3.2 RBCD 的 HE 和特殊染色 在临床上, 角膜格子状、颗粒状和斑块状营养不良为常见的角膜营养不良类型。研究表明, RBCD 也属于颗粒状角膜营养不良的 III 型, 因为 RBCD 的淀粉样蛋白和颗粒状角膜营养不良具有相同的杆状沉淀^[13]。在临床早期, 典型的病例可以根据临床表现和裂隙灯检查对常见的角膜营养不良做出诊断, 但是对于晚期和特殊情况的病例, 由于病变部位发生融合、重叠, 导致症状和体征具有重复性, 所以临床中要做出准确的诊断就需行组织学特殊染色等辅助检查。在组织学染色中, HE 染色可以确定病变的范围、大小和形状, 但是不能对疾病作出定性的判断, 而阿辛蓝染色、Masson 染色、

PAS 染色和刚果红染色则能对疾病作出定性的诊断。颗粒状角膜营养不良在 Masson 染色、阿辛蓝染色中呈阳性反应, 而在 PAS 染色中则为阴性反应, 这主要因为其含有嗜酸性的类胶原蛋白沉积物; 斑块状角膜营养不良在 Masson 染色、PAS 染色中呈阴性反应, 而阿辛蓝染色和胶性铁则为阳性反应, 这是因为其基质中的沉积物质主要为黏多糖; 格子状角膜营养不良在 Masson 染色、PAS 染色和刚果红染色中均为阳性反应, 这是因为基质中的沉着物为淀粉样沉着物, 而沉着物中又含有细纤维物质^[14-15]。经本家系组织学特殊染色的研究发现, RBCD 的病变主要累及角膜上皮和前弹力层, 该家系患者的 HE 染色、Masson 染色和刚果红染色均为阳性反应, 但阿辛蓝染色为阴性反应, 所以推断其沉着物应为包含细纤维、嗜酸性类胶原蛋白的淀粉样沉着物。

3.3 RBCD 与正常角膜蛋白的差异性表达 RBCD 的基因突变位点已经被证实, 与颗粒、格子、Avilino 角膜营养不良一样, 位于 5q31 领域的 TGFBI 基因^[16-17]。TGFBI 基因不同位点的突变导致不同类型的角膜营养不良。以往的研究认为 TGFBI 基因突变可能导致编码的角膜上皮蛋白结构和功能异常, 影响细胞外基质蛋白的相互作用及细胞的黏附和爬行, 并最终导致蛋白水解和折叠错误、突变蛋白及其碎片在角膜基质内沉着, 并引起一系列临床表现^[18]。作为 TGFBI 基因最常见的突变位点, R124 被 3 种不同的氨基酸置换, 导致 3 种不同类型的角膜营养不良。R124H 常见于 Avilino 角膜营养不良; R124C 常见于格子状角膜营养不良; R124L 所引起的 RBCD 地图型的临床表现更为严重, 较早地出现视力障碍和角膜移植术后的复

发^[19]。Korvatska等^[20]研究中,RBCD患者角膜中TGFBI蛋白含量与正常角膜相比高出25倍。王琪等^[18]研究推测TGFBI基因的R124L突变阻碍了TGFBI蛋白的正常水解,从而导致其异常堆积。Okada等^[21]认为此病的发病源于氨基酸的置换,R124L的突变是极性亲水性的精氨酸被非极性疏水性的亮氨酸代替所致。由于此突变改变了氨基酸的极性和亲水性,更大地影响了蛋白质的三维结构,导致了此病情的严重性。此家系中患者自4岁出现反复发作性双眼疼痛和异物感,伴畏光、流泪、眼红、视物模糊、角膜知觉减退等症状,通常双眼先后发病,7岁出现视力障碍,年轻时发作频繁,中年后发作次数减少。家系中有3例行双眼角膜移植手术,5例行准分子激光治疗性角膜切削术(excimer laser phototherapeutic keratectomy,PTK)治疗,均在术后1a内复发。

目前角膜营养不良的诊断除了根据病史、临床表现和体征之外,还包括其他的诊断方法,如组织病理学、角膜共焦激光显微镜、分子遗传学诊断、基因诊断等,而后几种诊断方法条件有限,还未能能在临床上普遍推广。组织病理学是基本的诊断方法,HE染色能判断病变的部位,特殊染色在角膜营养不良的鉴别诊断中发挥了重要的作用。本研究中,我们探讨了一中国家系RBCD患者的临床表现型与组织病理学之间的关系。该家系表现为RBCD的地图型,病变主要累及前弹力层,异常沉着物性质为细胞外淀粉样纤维蛋白沉着。基因突变为R124L改变。此外,对于这种预后较严重的角膜营养不良,除了提供明确的病理诊断外,遗传咨询和产前基因诊断也是我们今后面临的课题。

参考文献

- Lohse E, Stock EL, Jones JC, et al. Reis - Bücklers' corneal dystrophy. Immunofluorescent and electron microscopic studies. *Cornea* 1989;8(3):200-209
- 田欣,刘祖国,李勤,等. Reis-Bücklers角膜营养不良患者TGFBI基因突变. *中华眼科杂志* 2005;41(3):239-242
- Chiou AG, Florakis GJ, Copeland RL, et al. Recurrent Meesmann's corneal epithelial dystrophy after penetrating keratoplasty. *Cornea* 1998;17(5):566-570
- Takahashi K, Murakami A, Okisaka S, et al. Heterozygous Ala137Pro mutation in keratin 12 gene found in Japanese with Meesmann's corneal dystrophy. *Jpn J Ophthalmol* 2002;46(6):673-674
- Coleman CM, Hannush S, Covello SP, et al. A novel mutation in the helix termination motif of keratin K12 in a US family with Meesmann corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 1999;128(6):687-691

- Ren Z, Lin PY, Klintworth GK, et al. Allelic and locus heterogeneity in autosomal recessive gelatinous drop - like corneal dystrophy. *Hum Genet* 2002;110(6):568-577
- Alavi A, Elahi E, Tehrani MH, et al. Four mutations (three novel, one founder) in TACSTD2 among Iranian GDLN patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(10):4490-4497
- Hidayat AA, Risco JM. Amyloidosis of corneal stroma in patients with trachoma. A clinicopathologic study of 62 cases. *Ophthalmology* 1989;96(8):1203-1211
- Aldave AJ, Principe AH, Lin DY, et al. Lattice dystrophy - like localized amyloidosis of the cornea secondary to trichiasis. *Cornea* 2005;24(1):112-115
- Okada M, Yamamoto S, Watanabe H, et al. Granular corneal dystrophy with homozygous mutations in the kerato - epithelin gene. *Am J Ophthalmol* 1998;126(2):169-176
- Miller A, Solomon R, Bloom A, et al. Prevention of recurrent Reis - Bücklers dystrophy following excimer laser phototherapeutic keratectomy with topical mitomycin C. *Cornea* 2004;23(7):732-735
- Qiu WY, Zheng LB, Pan F, et al. New histopathologic and ultrastructural findings in Reis-Bücklers corneal dystrophy caused by the Arg124Leu mutation of TGFBI gene. *BMC Ophthalmol* 2016;16(1):158
- Qiu WY, Zheng LB, Pan F, et al. New histopathologic and ultrastructural findings in Reis-Bücklers corneal dystrophy caused by the Arg124Leu mutation of TGFBI gene. *BMC Ophthalmol* 2016;16(1):158
- 罗清礼,王琳,冯晓霞. 角膜格子、颗粒和斑状营养不良的特殊染色和超微结构研究. *中华眼科杂志* 1999;35(4):268
- 黄旅珍,陈荣家. 特殊染色在角膜营养不良病理诊断中的应用. *中国眼耳鼻喉科杂志* 2006;6(2):95-96
- Yu J, Zou LH, He JC, et al. Analysis of mutation of BIGH3 gene in Chinese patients with corneal dystrophies. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2003;39(10):582-586
- Cai J, Zhu L, Zha Y, et al. TGFBI Gene Mutation Analysis in Chinese Families with Corneal Dystrophies. *Genet Test Mol Biomarkers* 2016;20(7):388-392
- 王琪,张泳,肖迎,等. I型前弹力层角膜营养不良患者角膜与正常角膜蛋白的差异表达. *眼科新进展* 2010;30(10):937-940
- Ma K, Liu G, Yang Y, et al. TGFBI gene mutation analysis in a Chinese pedigree of Reis - Bücklers corneal dystrophy. *Mol Vis* 2010;16(63-65):556-561
- Korvatska E, Henry H, Mashima Y, et al. Amyloid and non-amyloid forms of 5q31-linked corneal dystrophy resulting from kerato - epithelin mutations at Arg - 124 are associated with abnormal turnover of the protein. *J Biol Chem* 2000;275(15):11465-11469
- Okada M, Yamamoto S, Tsujikawa M, et al. Two distinct kerato - epithelin mutations in Reis - Bücklers corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 1998;126(4):535-542