

特发性黄斑裂孔内界膜的组织病理学特征及细胞成分研究

彭娟 沙翔垠 文晔 梅开勇

【摘要】 背景 研究特发性黄斑裂孔(IMH)内界膜的组织病理结构和细胞成分对理解IMH的发病机制,从而预防IMH的发病具有重要意义,但目前的研究报道结果不一致。目的 研究IMH内界膜的组织病理学特征及细胞成分,检测内界膜中胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、CD45及CD44的表达分布情况,探讨IMH的发生机制。方法 收集2012年2月至2013年8月在广州医科大学附属第二医院行玻璃体切割联合内界膜剥离的IMH患者7例7眼的内界膜标本,制备石蜡切片,采用苏木精-伊红染色进行组织病理学观察,观察内界膜的组织结构及细胞成分;采用免疫组织化学法检测和定位内界膜中GFAP的表达;采用免疫荧光染色法检测内界膜中CD45及CD44的表达。结果 7例IMH内界膜石蜡切片均可见波浪弯曲状红染膜状结构,其中2例内界膜厚度均匀一致,含较少细胞,其他5例内界膜厚度不均,散在分布有色素上皮细胞、神经胶质细胞、成纤维细胞、巨噬细胞和淋巴细胞。免疫组织化学检测显示,GFAP表达于内界膜外层。免疫荧光染色表明,CD45阳性T淋巴细胞散在分布于内界膜组织中,黏附分子CD44多表达于内界膜的内层细胞。结论 IMH的内界膜上细胞成分较少,但Ⅲ期以上裂孔内界膜中存在神经胶质细胞和CD45阳性T淋巴细胞,表明IMH的发生过程伴有增生和免疫炎症反应。CD44作为黏附分子在内界膜中表达上调,促进IMH的增生和免疫炎症反应过程。

【关键词】 黄斑/病理; 视网膜孔/病因; 内界膜/病理, 细胞学; 组织病理检查; 免疫组织化学; 黏附分子/病理; 人; 特发性黄斑裂孔

Histopathological and cytological study on inner limiting membrane in idiopathic macular hole Peng Juan, Sha Xiangyin, Wen Ye, Mei Kaiyong. Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China

Corresponding author: Peng Juan, Email: sweetin245@163.com

【Abstract】 **Background** Researching the pathological characteristics and components of cells in internal limiting membrane of idiopathic macular hole (IMH) has an important clinical significance for the prevention of IMH. However, the study results are still disputable. **Objective** This study was to investigate the histopathological features of internal limiting membrane of IMH and the types of cells inside it, and explore the pathomechanism of IMH. **Methods** Seven specimens of internal limiting membrane were obtained during the vitrectomy with IMH patients in the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University from February 2012 to August 2013 under the informed consent of patients. The histopathological examination was performed for the structural observation and cellular identification of internal limiting membrane. The expression and location of glial fibrillary acidic protein (GFAP), CD45 and CD44 in internal limiting membrane were examined by using immunohistochemistry and immunofluorescence technology. **Results** All the seven specimens showed continuous undulating membrane with red staining. Two specimens appeared to be uniform in thickness and few cells were distributed in the specimens. The internal limiting membranes were uneven in thickness in the other specimens with retinal pigment epithelial cells, neuroglia cells, fibrocytes, macrophages and lymphocytes in them. Immunohistochemistry showed the positive expression of

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.10.011

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81100649,81160118)

作者单位:510260 广州医科大学附属第二医院眼科(彭娟、沙翔垠、文晔),病理科(梅开勇)

通信作者:彭娟,Email:sweetin245@163.com

GFAP in the outer layer of the specimens. CD45 positive cells were detected in the internal limiting membranes, and CD44 was detected in the inner layer of the specimens. **Conclusions** Few cells exist in the internal limiting membranes of IMH. However, neuroglia cells and CD45 positive cells emerge in the internal limiting membranes of stage 3 or above IMH eyes, indicating the proliferation of cells and immuno-inflammation response exist during the IMH development. The up-regulation of CD44 expression promotes inflammatory response of internal limiting membranes.

[**Key words**] Macula lutea/pathology; Retinal perforations/etiology; Internal limiting membrane/pathology, cytology; Histocytological examination; Immunohistochemistry; Adhesion molecule/pathology; Humans; Idiopathic macular hole

特发性黄斑裂孔 (idiopathic macular hole, IMH) 是一种与年龄相关的特发性眼病, 表现为黄斑区视网膜的全层缺失, 导致视物变形和视力下降。IMH 多发生于老年女性, 以双眼发病者多见^[1]。IMH 的发病机制目前尚不明确, 多数学者认为黄斑部特殊的解剖结构、玻璃体后皮质对黄斑区视网膜的牵拉以及玻璃体和内界膜收缩产生的切线方向的牵引是产生黄斑裂孔的主要原因^[2]。1998 年 Gass^[3] 提出了玻璃体后皮质切线牵拉学说, 依据这一理论衍生的玻璃体切割联合内界膜剥离术成为临床上治疗 IMH 的常用术式^[4], 但这一理论无法解释 IMH 形成的分子机制, 而对这一问题的研究对预防 IMH 的发生具有临床意义。随着玻璃体切割手术的广泛应用, 目前国内外更关注视网膜前膜的研究, 但对 IMH 内界膜的病理和生理研究以及细胞构成的研究少有报道。有研究显示 IMH 与免疫炎症有关^[5-6], 而 CD44 及 CD45 作为细胞表面跨膜蛋白, 在炎症及免疫性疾病中发挥重要作用。本研究中拟观察 IMH 内界膜的组织病理学特征及细胞学成分组成, 并观察 IMH 中胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、CD44 和 CD45 的表达。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 一般资料 收集 2012 年 2 月至 2013 年 8 月在广州医科大学附属第二医院眼科行玻璃体切割联合内界膜剥离的 IMH 患者 7 例 7 眼的内界膜标本, 患者年龄 51 ~ 75 岁; 其中男 2 例, 女 5 例; 5 例为双眼发病, 选取较严重眼内界膜标本; 患眼中 4 眼为 III 期裂孔, 3 眼为 IV 期裂孔。术前行直接检眼镜和 OCT 检查未发现黄斑前膜。排除标准: (1) 高度近视患者。(2) 有视网膜变性、年龄相关性退行性病变、中心性浆液性视网膜病变以及黄斑裂孔外的其他黄斑疾病者。(3) 有外伤史或激光灼伤史者。患者术前均签署知情同意书, 所有试验均遵循赫尔辛基宣言。

1.1.2 主要试剂 苏木素液、质量分数 0.5% 水溶性伊红染液、DAB 显色试剂、抗荧光衰减封片剂 (武汉博

士德生物公司); 鼠抗人 CD44 单克隆抗体 (抗体编号: sc-53069)、鼠抗人 CD45 单克隆抗体 (抗体编号: sc-28369) (美国 Santa Cruz 公司); 鼠抗人 GFAP 单克隆抗体 (抗体编号: sc-33673)、抗鼠 FITC 标记二抗 (抗体编号: F-9006) (美国 Sigma 公司); 抗鼠 PE 标记二抗 (抗体编号: 715-075-151) (美国 Immuno Research 公司); 抗鼠 HRP 标记二抗 (抗体编号: 170-6516) (美国 Bio-RAD 公司); Hoechst 染色剂 (北京雷根生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本收集和制备 患者均接受玻璃体切割联合内界膜剥离术。采用标准三通道睫状体平坦部玻璃体切割术, 术中使用曲安奈德对玻璃体后皮质进行染色。用剥膜镊剥离并夹出内界膜, 经 PBS 冲洗后置入体积分数 10% 甲醛溶液标本管中, 常规石蜡包埋, 连续切片。

1.2.2 IMH 患眼内界膜标本的组织病理学检查 石蜡切片二甲苯中脱蜡 5 min, 共 3 次, 无水乙醇 5 min, 体积分数 90% 乙醇 2 min, 70% 乙醇 2 min, 蒸馏水 2 min。苏木素染色 4 min, 自来水中冲洗约 30 s, 洗去多余的染色液; 体积分数 1% 盐酸乙醇分化 5 s, 自来水冲洗 1 min; 体积分数 1% 氨水返蓝 5 ~ 10 s, 自来水冲洗 1 min, 蒸馏水再洗涤 1 min; 伊红染色 30 s, 95% 乙醇脱水 2 min, 共 2 次, 无水乙醇再脱水 2 min, 二甲苯透明 5 min, 共 3 次。中性树脂封片, 光学显微镜下观察。

1.2.3 免疫组织化学法检测内界膜标本中 GFAP 的表达 石蜡切片脱蜡方法同 1.2.2 部分, 用体积分数 3% H₂O₂ 孵育 10 s, PBS 漂洗, 每次 5 min, 共 3 次; 加胎牛血清室温封闭 30 min, 滴加一抗 (1:100), 4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗, 每次 5 min, 共 3 次; 滴加 HRP 标记二抗 (1:20), 室温下避光孵育 30 min, PBS 漂洗, 每次 5 min, 共 3 次; DAB 显色 5 s, 蒸馏水清洗; 加苏木素染色 1 min, 蒸馏水冲洗 1 min; 95% 乙醇脱水 2 min, 共 2 次, 无水乙醇再脱水 2 min, 二甲苯透明 5 min, 共 3 次。中性树脂封片, 所有切片光学显微镜下观察并拍照, 每张片取 5 个不同视野 (40 倍显微镜下), 每个视野有 5 个以上阳性细胞判定该标本为阳性。

1.2.4 免疫荧光染色法检测内界膜标本中 CD45 和 CD44 的表达 石蜡切片脱蜡方法同 1.2.2 部分, PBS 漂洗, 每次 5 min, 共 3 次; 加胎牛血清室温封闭 30 min, 滴加一抗 (1:100), 4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗, 每次 5 min, 共 3 次; 滴加荧光二抗 (1:30), 室温下避光孵育 30 min, PBS 漂洗, 每次 5 min, 共 3 次; 加 Hoechst 染色剂染核 30 s。封片剂封片, 荧光显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 IMH 患眼内界膜的组织病理学表现

7 例 IMH 内界膜组织均呈连续的透明薄膜样结构, 易卷曲成条状, 有一定的弹性。苏木精-伊红染色后可见内界膜标本均显示为红染膜状结构, 呈波浪弯曲状, 内界膜的内层表面较平滑, 边缘整齐, 而外层欠光滑, 可见红细胞沉积 (图 1A)。3 例内界膜标本厚度较薄, 内界膜含细胞较少, 偶见神经胶质细胞、纤维细胞等 (图 1B)。4 例内界膜相对较厚, 可见多层细胞结构。内界膜呈波浪样膜状结构, 细胞较少, 部分内界膜组织中散在分布神经胶质细胞、成纤维细胞、巨噬细胞和淋巴细胞等, 其中成纤维细胞呈梭形, 细胞核较长; 巨噬细胞为吞噬细胞, 细胞体积和细胞核均较大; 淋巴细胞体积较小, 细胞核较小、较圆 (图 1C, D)。

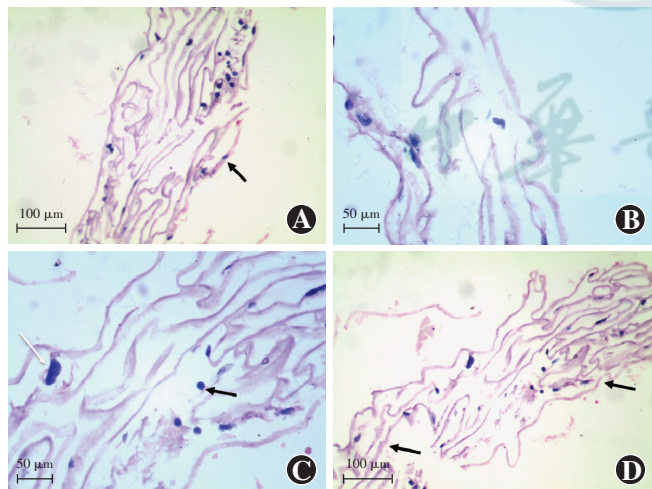


图 1 IMH 患眼内界膜的组织病理学观察 (HE) A: 内界膜内表面 (左侧) 边缘较整齐, 外表面不规则 (右侧), 可见成纤维细胞 (箭头) (标尺 = 100 μm) B: 内界膜较薄且整齐, 细胞数较少 (标尺 = 50 μm) C: 膜状组织中可见巨噬细胞 (白箭头) 和淋巴细胞 (黑箭头) (标尺 = 50 μm) D: 内界膜组织中可见较多细胞 (箭头) (标尺 = 100 μm)

2.2 IMH 患眼内界膜中 GFAP 的表达

IMH 患者内界膜组织中散在分布 GFAP 阳性细胞, 表现为细胞质中的棕褐色染色颗粒, 多见于内界膜

内层 (图 2)。

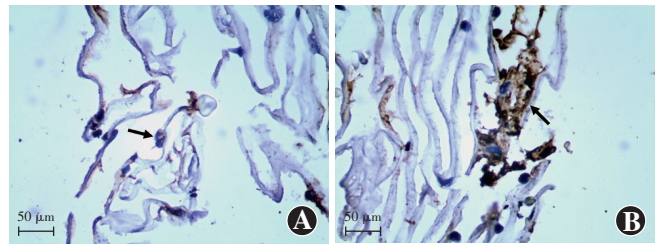


图 2 IMH 内界膜组织 GFAP 免疫组织化学染色 (DAB, 标尺 = 50 μm) A: 部分标本中可见散在的 GFAP 阳性细胞, 细胞质呈棕色染色 (箭头) B: 部分标本中可见较多的 GFAP 阳性细胞 (箭头)

2.3 IMH 患眼内界膜中 CD45、CD44 的表达分布

7 例黄斑内界膜标本中 4 例 CD45 表达阳性, 呈绿色荧光, 细胞核被 Hoechst 蓝染。CD45 散在表达于各层膜样结构中 (图 3A), 另有 3 例无 CD45 表达。7 例黄斑内界膜标本中 6 例可见 CD44 的阳性表达, 呈红色荧光, 细胞核被 Hoechst 蓝染。CD44 阳性细胞散在分布于内界膜中 (图 3B), 以内外表面阳性细胞较多, 而中央波浪状的膜状结构仅有微弱荧光, 为非特异性染色, 1 例内界膜较少有阳性表达。

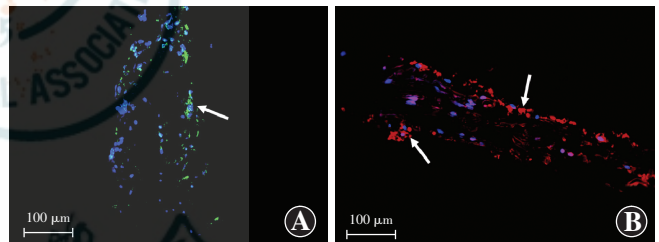


图 3 IMH 患眼内界膜组织免疫荧光染色观察 (标尺 = 100 μm) A: CD45 阳性细胞染色 (FITC) 细胞散在表达于内界膜组织中 (箭头) B: CD44 阳性细胞染色 (PE) 内界膜内外表面阳性细胞较多 (箭头)

3 讨论

本研究中发现玻璃体切割术剥离的组织以均质波浪状的内界膜为主, 均可见细胞增生。Gandorfer 等^[7]对 10 例 IMH 患者内界膜组织进行组织学病理检查, 发现内界膜本身不包含细胞和纤维条索, 认为黄斑前膜中存在细胞成分。本研究中发现 7 例 IMH 内界膜组织中有 4 例内界膜较厚, 细胞成分多, 故认为内界膜上可能存在细胞增生, 与 Mendrinós 等^[8]的报道相一致, 但与李加青等^[9]的研究结果不同。Schumann 等^[10]在 60 例不同阶段 IMH 患者的内界膜组织中均发现存在神经胶质细胞、玻璃体细胞和肌纤维样细胞, 且细胞表现出不同程度的增生和移行, 其中神经胶质细胞和玻璃体细胞是增生迁移的主要细胞。研究认

为,在 IMH 的初期以视网膜变性为主,而随着黄斑裂孔的形成和发展,神经胶质细胞、淋巴细胞可迁移至内界膜上,在生长因子和趋化因子的相互作用下增生并发生转化。本研究的病例较少,且 IMH 都是Ⅲ期以上,与视网膜前膜的研究结果比较,IMH 的内界膜组织中细胞数量和类型较少,层数较薄^[5]。

GFAP 是相对分子质量为 50 000 ~ 52 000 的中间丝蛋白,主要存在于神经组织星形胶质细胞内,是神经胶质细胞的特异性分子标志物^[11]。本研究结果发现,IMH 内界膜组织中存在 GFAP 阳性细胞,证实有神经胶质细胞存在。神经胶质细胞能合成和分泌大量神经生长因子,如神经生长因子和碱性成纤维细胞生长因子,具有维持神经元活性和促进神经细胞轴突生长的作用。在正常视网膜中,Müller 细胞贯穿神经感觉层,其纤维从外界膜纵向伸展到内界膜,对视网膜起支持和代谢营养作用。在 IMH 形成后,视网膜中的 Müller 细胞和神经胶质细胞可能在各种炎症因子作用下迁移至内界膜外表面,起到修复营养的作用。

CD45 又称白细胞共同抗原,广泛存在于白细胞的表面,属跨膜蛋白。CD45 是细胞膜信号传导的关键分子,在淋巴细胞的发育成熟、功能调节及信号传递中具有重要意义。在本研究中,Ⅲ期以上裂孔的内界膜组织中可见散在分布的 CD45 阳性细胞,证明在 IMH 裂孔形成过程中可能有细胞免疫机制的参与,且以 CD45 阳性 T 淋巴细胞作用为主。在黄斑裂孔形成以后,淋巴细胞可以破坏血-视网膜屏障进入玻璃体腔,与移行的色素细胞、神经胶质细胞等接触,分泌细胞因子,促进炎症反应和巨噬细胞的吞噬功能。目前研究认为,眼内细胞的增生调控是由炎症和免疫功能细胞及其分泌的多种活性因子和多肽生长因子共同参与而完成的^[12]。本研究结果显示,CD45 阳性 T 细胞在 IMH 形成和发展过程中起重要作用。

CD44 是一种细胞表面跨膜蛋白,在免疫、炎症反应和组织纤维化中具有重要作用。作为归巢蛋白,CD44 可诱导炎症细胞趋化、游走和定位,参与细胞内信号转导,诱导细胞因子释放和 T 细胞活化,激活成纤维细胞等细胞分泌生长因子、前炎性介质,并表达某些黏附分子,同时 CD44 也是黏附分子的重要成员之一^[13]。在正常视网膜细胞中 CD44 不表达。本研究结果发现,7 例 IMH 中有 6 例内界膜组织中表达 CD44,这与在增生性玻璃体视网膜病变的视网膜前膜中观察结果一致^[6]。研究发现,增生性视网膜前膜较厚,其中存在较多细胞,而在 IMH 内界膜中细胞成分较少,推测黄斑中心凹裂孔形成后,神经胶质细胞向内

界膜表面移行,随着视网膜脱离,移行的细胞种类增加,细胞数量逐渐增多,CD44 作为黏附分子可能通过促进细胞移行,促进细胞与细胞外基质结合来发挥作用。CD44 还可能参与淋巴细胞的激活和炎性介质的释放,并促进神经胶质细胞向纤维母细胞转化,加速组织的增生修复。

综上所述,IMH 主要由玻璃体液化后皮质产生的切线方向牵拉力形成。内界膜主要由胶质细胞组成,但多数Ⅲ期以上裂孔的患者内界膜中有 CD45 阳性 T 细胞增生浸润。黏附分子 CD44 在内界膜中表达上调,可能参与 IMH 的发生和发展过程。由于本研究样本量有限,IMH 具体的发病机制研究尚待进一步大样本的观察。

参考文献

- [1] 刘家琦.实用眼科学[M].2版.北京:人民卫生出版社,1999:514-515.
- [2] Yeh PT, Chen TC, Yang CH, et al. Formation of idiopathic macular hole-reappraisal[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2010, 248(6): 793-798. doi:10.1007/s00417-009-1297-x.
- [3] Gass JD. Age-dependent idiopathic macular foramen. Current concepts of the pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. Ophthalmology, 1995, 92(5): 617-625.
- [4] Passemard M, Yakoubi Y, Muselier A, et al. Long-term outcome of idiopathic macular hole surgery[J]. Am J Ophthalmol, 2010, 149(1): 120-126. doi:10.1016/j.ajo.2009.08.003.
- [5] 张永红,朱小华,唐罗生.玻璃体切割术后视网膜前膜中Ⅱ、Ⅳ型胶原及 CD8 T 淋巴细胞检测[J].眼科研究,2008,26(10):751-754.
- [6] 许国忠,林季建.粘附分子 CD44v6 在增生性视网膜前膜中的表达[J].浙江医学,2006,28(10):795-797.
- [7] Gandorfer A, Scheler R, Haritoglou C, et al. Pathology of the macular hole rim in flat-mounted internal limiting membrane specimens[J]. Retina, 2009, 29(8): 1097-1105. doi:10.1097/IAE.0b013e3181aa8fb1.
- [8] Mendrinou E, Tsilimbaris MK, Tsoka P, et al. Immunohistochemical analysis of internal limiting membrane by confocal microscopy in a case of stage 4 idiopathic macular hole[J]. Eye, 2010, 24(6): 1121-1123. doi:10.1038/eye.2009.258.
- [9] 李加青,唐仕波,刘文,等.特发性黄斑裂孔黄斑前膜及内界膜病理特征的初步报告[J].实用医学杂志,2002,18(4):354-355.
- [10] Schumann RG, Eibl KH, Zhao F, et al. Immunocytochemical and ultrastructural evidence of glial cells and hyalocytes in internal limiting membrane specimens of idiopathic macular holes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(11): 7822-7834. doi:10.1167/iovs.11-7514.
- [11] Chen H, Wu JP, Tzeng SE. Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(3): 397-405. doi:10.1002/jnr.10303.
- [12] Lei H, Rheaume MA, Kazlauskas A. Recent developments in our understanding of how platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors contribute to proliferative vitreoretinopathy[J]. Exp Eye Res, 2010, 90(3): 376-381. doi:10.1016/j.exer.2009.11.003.
- [13] Negi LM, Talegaonkar S, Jaggi M, et al. Role of CD44 in tumour progression and strategies for targeting[J]. Drug Target, 2012, 20(7): 561-573. doi:10.3109/1061186X.2012.702767.

(收稿日期:2015-04-17)

(本文编辑:刘艳 张宇)