

结膜松弛症球结膜成纤维细胞培养的研究

李轶捷¹, 张兴儒¹, 项敏泓¹, 张 隆², 李青松¹, 韩竹梅¹

基金项目: 中国上海市普陀区卫生系统自主创新科研基金资助项目 (No. PTKW2011-B-112)

作者单位: (200062) 中国上海市, 上海中医药大学附属普陀医院¹眼科; ²实验中心

作者简介: 李轶捷, 女, 硕士, 研究方向: 眼表泪液学疾病。

通讯作者: 张兴儒, 眼科学教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 副院长兼眼科主任, 中华中医药学会眼科分会委员, 主编出版《结膜松弛症》专著, 结膜松弛症研究获得上海市科技成果4项, 上海医学科技奖2项, 研究方向: 白内障、青光眼、眼视光学、眼表泪液疾病。zhangxingru928@hotmail.com

收稿日期: 2011-12-29 修回日期: 2012-03-05

Cultivation of fibroblasts of bulbar conjunctival in conjunctivochalasis

Yi-Jie Li¹, Xing-Ru Zhang¹, Min-Hong Xiang¹, Long Zhang², Qing-Song Li¹, Zhu-Mei Han¹

Foundation item: Self-innovation Scientific Research Project of Health System in Shanghai Putuo District, China (No. PTKW2011-B-112)

¹Department of Ophthalmology; ²Experiment Center, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Medicine, Shanghai 200062, China

Correspondence to: Xing-Ru Zhang. Department of Ophthalmology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Medicine, Shanghai 200062, China. zhangxingru928@hotmail.com
Received: 2011-12-29 Accepted: 2012-03-05

Abstract

• AIM: To observe the fibroblasts of normal bulbar conjunctival and conjunctivochalasis cultivated by different medium as well as qijingmingmu soup serum in order to screening the appreciate method for the cultivation of fibroblasts of conjunctivochalasis.

• METHODS: We collected loose conjunctiva tissue from 16 cases of conjunctivochalasis patients, pterygium tissue from 11 cases, and normal conjunctiva tissue from 5 cases. The growth state of fibroblast was observed to select the most suitable medium for the growth of fibroblasts of conjunctivochalasis.

• RESULTS: DMEM/F12 can make a few fibroblast of conjunctivochalasis overflow from the tissue, but can not subculture. DMEM-H (contained 100mL/L FBS, 1μL/mL FGS) can make the fibroblast of conjunctivochalasis grow smoothly, and can transfer.

• CONCLUSION: The most appropriate training medium for the fibroblast of conjunctivochalasis is DMEM-H, which adds 100mL/L fetal bovine serum, 1μL/mL FGS, 100U/mL penicillin, and 100μg/mL streptomycin.

• KEYWORDS: conjunctivochalasis; fibroblasts; qijingmingmu soup

Li YJ, Zhang XR, Xiang MH, et al. Cultivation of fibroblasts of bulbar conjunctival in conjunctivochalasis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(4):632-635

摘要

目的: 为了筛选适合结膜松弛症结膜成纤维细胞培养的方法, 对不同培养基培育及杞精明目汤药物血清作用前后的结膜松弛症和正常球结膜成纤维细胞进行观察。

方法: 收集结膜松弛症松弛结膜组织16例、翼状胬肉组织11例和正常球结膜组织5例, 观察成纤维细胞的生长状态, 筛选最适合结膜松弛症成纤维细胞生长的培养基。

结果: 采用DMEM/F12培养基可使结膜松弛症成纤维细胞少量从组织块内溢出, 但不能传代。采用含100mL/L胎牛血清、1μL/mL成纤维细胞生长添加物(FGS)的DMEM-H培养基可使结膜松弛症成纤维细胞顺利生长, 且能够传代。

结论: 最适宜培养结膜松弛症成纤维细胞的培养基是含100mL/L胎牛血清、1μL/mL FGS、100U/mL青霉素、100μg/mL链霉素的DMEM-H培养基。

关键词: 结膜松弛症; 成纤维细胞; 杞精明目汤

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.04.09

李轶捷, 张兴儒, 项敏泓, 等. 结膜松弛症球结膜成纤维细胞培养的研究. 国际眼科杂志 2012;12(4):632-635

0 引言

球结膜组织的成纤维细胞增生、变性是许多眼病的主要发病原因之一^[1-3], 如结膜松弛症、翼状胬肉、由于滤过泡瘢痕形成所致的青光眼滤过性手术失败、眼外伤和糖尿病等所致的增殖性玻璃体视网膜病变等, 都与细胞的增生、收缩和变性有关。近年来, 为探讨成纤维细胞改变所致结膜松弛症的发病机制、预防与治疗, 成纤维细胞离体培养成为重要研究课题。目前多数报道细胞来源是家兔的皮肤或球结膜^[4,6], 以及手术病眼的Tenon's囊^[3]等组织作为成纤维细胞培养的细胞来源, 为了使培养的细胞更能反映人眼结膜松弛症成纤维细胞的基本特性, 该实验采用人眼结膜松弛症球结膜、胬肉组织、正常球结膜培养成纤维细胞获得成功, 现将方法及结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 患者的选取 按知情同意原则, 选取在上海中医药大学附属普陀医院眼科于2009-09/2011-02接受结膜松弛症切除术的结膜松弛症患者16例16眼, 其中男6例6眼, 女10例10眼; 选取2010-04/2011-02接受翼状胬肉切除术患者11例11眼, 其中男6例6眼, 女5例5眼; 正常球结膜取自2010-04/2011-02接受白内障手术及斜视患者5例5眼, 其中男2例2眼, 女3例3眼。按结膜松弛症诊断标准^[5,7]入选的患者中, 结膜松弛症引起的干涩、异

物感、泪溢、视物模糊、视疲劳、疼痛等症状明显;裂隙灯显微镜检查球结膜过度松弛成皱褶堆积在下睑缘和内、外眦部之间,影响泪河,堵塞泪小点;结膜松弛症分级 \geq II级^[6,8],经规范药物等保守方法治疗3mo无明显效果,并经过医院伦理委员会及患者知情同意开展手术治疗。随机选择单纯翼状胬肉切除术的病例,排除翼状胬肉主诉外无眼部其他不适主诉,翼状胬肉较大且肥厚、发展较快,胬肉头部侵及角膜超过角膜缘 \geq 2mm,影响视功能及患者美观者。

1.1.2 实验动物 健康新西兰大白兔6只(雌雄各3只),体重2.5kg,由上海中医药大学附属普陀医院实验动物中心提供,许可证号[SCXK(沪)2007-0011];SD大鼠24只,雄性,体重 180 ± 20 g,由上海中医药大学附属普陀医院实验动物中心提供,许可证号[SCXK(沪)2007-0005];饲养条件:每笼6只,饲养温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度40%~70%。

1.1.3 实验试剂 DMEM-H培养基、DMEM-L培养基、DMEM/F12培养基、PBS溶液、葡萄糖,上海化学试剂公司提供;胎牛血清(FBS),上海源聚生物工程公司提供;成纤维细胞生长添加剂(FGS),北京裕恒丰生物有限公司。杞精明目汤(黄精20g,枸杞子15g,麦冬20g,茯苓10g,炙甘草3g,旱莲草15g,川芎3g),由上海中医药大学附属普陀医院中药房提供,水煎,浓缩为含生药3.35g/mL,4℃冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 杞精明目汤药物血清的制备 SD大鼠适应性饲养1wk后,大鼠根据体质量随机分为两组:正常组和给药组。根据“人和动物之间按体表面积折算的等效剂量比值表”计算出大鼠等效剂量(相当于70kg成人用量),按照1mL/100g体质量的剂量给大鼠灌胃,正常对照组给予等量生理盐水。每天2次,连续灌胃3d。末次灌胃后1h,腹主动脉采血,3000r/min离心15min后,分离血清(切忌取到血细胞),血清呈透明、清亮、淡黄色、无沉淀、未溶血,经 56°C 和30min灭活处理后,用 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, -20°C 保存备用1mo。

1.2.2 标本的采集与制备 (1)结膜松弛症松弛结膜采集:收集结膜松弛症患者手术切除的松弛结膜组织16例,5g/L利多卡因眼表面麻醉后,用无齿镊轻轻提起松弛结膜,估计需切除结膜量,按角膜缘弧度以设计图形半月形切除松弛结膜,10/0尼龙线连续缝合结膜^[9-14]。每1例采集的结膜组织用9g/L生理盐水冲洗3次,用眼科显微剪剪成 $0.5 \sim 1\text{mm}$ 的小块,平铺于6孔板内,每次分别加入3mL含生长因子的1640,DMEM-L,DMEM/F12,DMEM-H四种培养基中的一种。用倒置显微镜观察成纤维细胞的生长状态。(2)胬肉组织采集方法:手术切除的翼状胬肉11例,5g/L利多卡因眼表面麻醉后,在显微镜下,用眼科显微剪将胬肉头部自角膜面分离至角巩膜缘,在近半月皱襞处将胬肉头部及部分体部组织切除,然后将巩膜残留组织清除干净,适当烧灼止血,余下两个结膜切口10/0尼龙线对侧缝合,每一例采集的结膜组织,用9g/L生理盐水冲洗3次,用眼科显微剪剪成 $0.5 \sim 1\text{mm}^2$ 的小块,平铺于6孔板内,每次分别加入3mL含生长因子的1640,DMEM-L,DMEM/F12,DMEM-H四种培养基中的一种。用倒置显微镜观察成纤维细胞的生长状态。

1.2.3 成纤维细胞培养

1.2.3.1 兔球结膜成纤维细胞的培养 将兔固定于解剖

台上,耳缘静脉注入空气猝死,剪取兔球结膜组织,用生理盐水反复冲洗,将兔球结膜切成 $0.5 \sim 1\text{mm}^2$ 的小块,平铺于6孔板内,每孔加入3mL培养基(DMEM-L,含100mL/L胎牛血清、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、100U/mL青霉素),放置于 37°C 培养箱内,观察细胞4,12,24和48h,48h后每天观察一次细胞生长变化,连续观察7d。

1.2.3.2 大鼠球结膜成纤维细胞的培养 将大鼠脱颈椎死后固定于实验解剖台上,剪取大鼠球结膜组织,用生理盐水反复冲洗,将大鼠球结膜切成 $0.5 \sim 1\text{mm}^2$ 的小块,平铺于6孔板内,每孔加入3mL培养基(1640,含100mL/L胎牛血清、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、100U/mL青霉素),放置于 37°C 培养箱内,观察细胞4,12,24和48h,48h后每天观察一次细胞生长变化,连续观察7d。

1.2.3.3 人眼成纤维细胞的培养 将结膜松弛症手术中切除的松弛结膜、翼状胬肉手术中切除的翼状胬肉组织和接受白内障手术及斜视患者的正常球结膜组织切成 $0.5 \sim 1\text{mm}^2$ 的小块,平铺于6孔板内,采用下列9种不同的培养基:(1)含100mL/L胎牛血清、100U/mL青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM-L培养基;(2)含200mL/L胎牛血清、100U/mL青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM-L培养基;(3)含100mL/L胎牛血清、100U/mL青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的1640培养基;(4)含200mL/L胎牛血清、100U/mL青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的1640培养基;(5)含100mL/L胎牛血清、100U/mL青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM-H培养基;(6)含200mL/L胎牛血清、100U/mL青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM-H培养基;(7)含100mL/L胎牛血清与EGF $2\mu\text{g}/\text{mL}$,EGF $2\mu\text{g}/\text{mL}$,人胰岛素 $1\mu\text{g}/\text{mL}$,氢化可的松 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$,100U/mL青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM/F12培养基;(8)含100mL/L胎牛血清、FGS $1\mu\text{L}/\text{mL}$, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、100U/mL青霉素的DMEM-H培养基;(9)含有200mL/L杞精明目汤药物血清、100mL/L胎牛血清、FGS $1\mu\text{L}/\text{mL}$, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、100U/mL青霉素的DMEM-H培养基。每孔分别加入3mL培养基,放置于 37°C 培养箱内,观察细胞4,12,24,48h,48h后每天观察一次细胞生长变化,根据细胞的生长情况用倒置显微镜拍照,最长观察3mo。

2 结果

2.1 兔球结膜成纤维细胞形态变化 采用DMEM-L培养基培养兔球结膜成纤维细胞,12h后有细胞溢出,2d后增殖至80%,细胞尾足清晰,边缘清楚,立体感强,折光性好(图1)。

2.2 大鼠球结膜成纤维细胞形态变化 采用1640培养基培养SD大鼠球结膜成纤维细胞,2d后有细胞溢出,7d后增殖至80%,镜下可见大鼠球结膜成纤维细胞较兔球结膜成纤维细胞生长更慢,细胞体积较小(图2)。

2.3 患者球结膜成纤维细胞形态变化

2.3.1 结膜松弛症患者 采用下列培养基:(1)含100mL/L胎牛血清、100U/mL青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM-L培养基;(2)含200mL/L胎牛血清、100U/mL青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的DMEM-L培养基;(3)含100mL/L胎牛血清、100U/mL青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的1640培养基;(4)含200mL/L胎牛血清100U/mL青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的1640培养基。培养人眼结膜松弛症成纤维细胞,4,12,24,48,48h后每天观察一次细胞生长变化,连续观察7d,镜下未见细胞溢出。

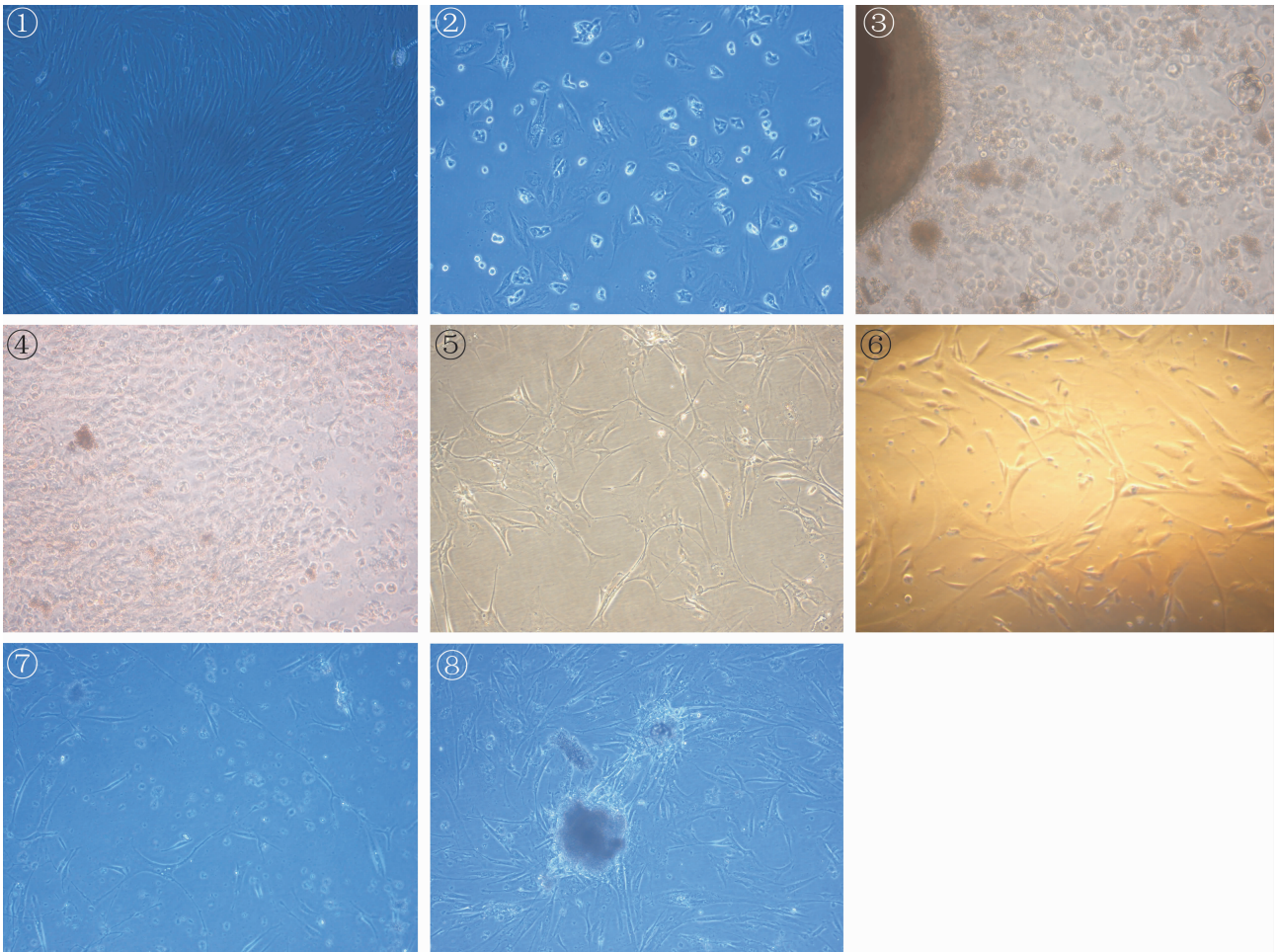


图1 DMEM-L培养基培养兔球结膜成纤维细胞2d后(×100)。
图2 1640培养基培养SD大鼠球结膜成纤维细胞7d后(×100)。
图3 结膜松弛症成纤维细胞7d,左侧为松弛结膜组织块,细胞界线不清,成纤维细胞的梭形形态不明显,部分细胞呈圆形(×100)。
图4 结膜松弛症成纤维细胞原代10d呈马赛克样,尾足不清晰,细胞较小,立体感弱,遮光性差,细胞呈圆形(×100)。
图5 结膜松弛症成纤维细胞第2代,传代后48h,细胞呈梭形,立体感强,折光度好,分布均匀(×100)。
图6 胬肉组织成纤维细胞原代马赛克样。
图7 胬肉组织成纤维细胞第3代细胞较原代更加饱满,立体感强。
图8 胬肉组织成纤维细胞第7代细胞形态较长,分布不均,局部出现岛样细胞团块。

采用DMEM/F12培养基,培养人眼结膜松弛症成纤维细胞,2~4d有少量细胞从松弛结膜组织中溢出,每2d换液一次,7d细胞增殖至80%,成纤维细胞的梭形形态不明显,无法正常传代,细胞之间界线不清,内容物较多,内有空泡,立体结构较弱,死亡率较高,并逐渐变为圆形(图3)。

采用含100mL/L胎牛血清、FGS 1 μ L/mL、100 μ g/mL链霉素、100U/mL青霉素的DMEM-H培养基培养结膜松弛症成纤维细胞,2~5d细胞开始溢出,细胞饱满呈马赛克样(图4~5),且能够正常增殖和传代;3~5代细胞形态更加饱满,梭形,立体结构良好,呈对数生长,6~7代开始凋亡,局部出现岛样细胞团块,8~10代停止生长,调整胎牛血清浓度至200mL/L后,凋亡加速。

采用含200mL/L中药血清的DMEM-H培养基培养结膜松弛症成纤维细胞,12h后细胞明显增殖,局部如原代细胞呈马赛克样;24h后,细胞生长仍然良好,达到90%,细胞形态呈马赛克样;48h后细胞开始死亡,部分细胞不能维持梭形形态,变为圆形。

2.3.2 翼状胬肉患者 采用含100mL/L胎牛血清、FGS 1 μ L/mL、100 μ g/mL链霉素、100U/mL青霉素的DMEM-H

培养基培养胬肉组织成纤维细胞,从组织块中游离出单层细胞,原代细胞立体感强且呈马赛克样(图6);3~5代细胞形态更加接近梭形,折光度较好(图7),6~7代细胞开始凋亡,表现为形态细长,分布不均,局部出现岛状细胞团块(图8),8~10代基本停止生长。

2.3.3 正常球结膜 采用含100mL/L胎牛血清(或200mL/L胎牛血清)、100 μ g/mL链霉素、100U/mL青霉素的DMEM-H培养基培养正常球结膜成纤维细胞。细胞可正常增殖和传代,但7d细胞形态开始改变,表现为细胞体积变小、两端细长、立体感较弱,折光性较差。

3 讨论

离体成纤维细胞培养的细胞来源主要是家兔皮肤、球结膜和皮肤病患者的皮肤组织^[4-6],近年来国外有用青光眼手术眼的Tenon囊^[3]作为细胞培养的组织来源。病眼组织细胞虽然来自于人体,但难以体现结膜松弛症眼组织学特性。人眼结膜松弛症球结膜培养的成纤维细胞,其生长和适应能力均较差,细胞培养有一定的难度。参照国内外已报道结膜成纤维细胞培养方法,采用8种不同培养基培养结膜松弛症球结膜成纤维细胞,经过反复筛选,成

功地培养出结膜松弛症患者手术中切除的松弛结膜组织成纤维细胞,能够连续传代 3mo,细胞生长期及细胞形态均正常。

在人眼成纤维细胞培养过程中培养基的选择至关重要,一般的细胞株多用 1640 培养,国内文献报道兔、大鼠、人皮肤组织和正常球结膜成纤维细胞多用 1640 和 DMEM 培养^[4,7,15],但是这两种培养基用于人眼结膜松弛症成纤维细胞,连续观察 7d,镜下未见细胞溢出,故该培养方法并不适用于结膜松弛症成纤维细胞。国外文献报道^[7,16]使用 DMEM/F12 培养基培养正常球结膜成纤维细胞,结膜松弛症成纤维细胞能够在该培养基中存活,但是不能传代,说明该培养基虽然适合正常球结膜成纤维细胞的培养,但不适合结膜松弛症成纤维细胞。美国 science 实验室^[17-19]使用 DMEM-H 培养基(含 2% 胎牛血清、0.1% FGS、100 μ g/mL 链霉素、100U/mL 青霉素)培养人球结膜成纤维细胞株,可传 8~10 代,我们使用该培养基可使猪肉组织成纤维细胞很好的生长,故应用于结膜松弛症成纤维细胞培养,结果显示该培养基可以很好地使结膜松弛症成纤维细胞生长,根据文献报道考虑到该实验培养的是原代细胞,胎牛血清浓度提高至 100mL/L^[4,7,20]。

在人眼成纤维细胞培养过程中血清浓度选择也很关键,一般的细胞株贴壁状况不佳时,常规的方法是提高血清浓度^[5],但是成纤维细胞提高血清浓度至 20% 后凋亡较快。美国 science 实验室相关数据表明^[19],培养正常球结膜成纤维细胞株时,使用的胎牛血清的浓度为 2%,考虑到该实验培养的是原代细胞而非细胞株,使用 10% 胎牛血清效果良好,采用含 20% 胎牛血清的 DMEM-H 培养基后,结膜松弛症成纤维细胞凋亡反而加速,说明该细胞属于低血清细胞^[19]。在培养基中加入 FGS 生长因子有利于成纤维细胞生长,经反复比较,最适合培养结膜松弛症成纤维细胞的胎牛血清浓度为 100mL/L,且因 FGS 能促进该细胞生长,并减缓猪肉组织成纤维细胞和结膜松弛症成纤维细胞的凋亡,故最适合该细胞的培养基是含 100mL/L 胎牛血清、1mL/L FGS、100 μ g/mL 链霉素、100U/mL 青霉素的 DMEM-H 培养基。加入杞精明目汤药物血清后成纤维细胞继续增殖,形态呈马赛克样,24h 内细胞未死亡,满足成纤维细胞的实验要求,为进一步研究杞精明目汤药物血清对结膜松弛症球结膜成纤维细胞 MMPs 和 TIMPs 的影响,以及杞精明目汤对结膜松弛症的干预提供了实验基础。

最适宜培养结膜松弛症成纤维细胞的培养基是含 100mL/L 胎牛血清、1mL/L FGS、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM-H 培养基。在该培养基中加入杞精明目

汤药物血清,细胞仍然正常增殖,能满足实验要求。为进一步检测结膜松弛症成纤维细胞中 MMPs 和 TIMPs 的表达奠定了基础。

参考文献

- 1 张兴儒,蔡瑞霞,王宝华,等. 结膜松弛症的组织病理学观察. 中华眼科杂志 2004;40(1):37-39
- 2 张兴儒,俞彰,刘焯翔,等. 结膜松弛症超微结构电镜研究. 中国耳鼻咽喉科杂志 2003;3(4):223-224
- 3 张佳莹,冷非,彭绍民. 抗青光眼表药物与人结膜成纤维细胞 TGF- β ,MMP 的表达. 国际眼科杂志 2007;7(5):1294-1297
- 4 朱晓弘. 兔结膜成纤维细胞的体外培养. 国际眼科杂志 2005;5(2):253-255
- 5 张晓峰,盛伟华,杨吉成. 兔眼角膜、结膜成纤维细胞的培养. 苏州大学学报 2002;22(2):141-143
- 6 张坤丽,张惠淑,杨树立. 兔结膜成纤维细胞的培养体会. 眼科新进展 1995;15(2):1-2
- 7 安美霞,吴开力,林少春. 正常球结膜与翼状胬肉成纤维细胞生长增殖状况的对比观察. 中国实用眼科杂志 2007;11(25):1260-1263
- 8 张晓静,任兵,高晓唯. MMPs/TIMP 在增殖性玻璃体视网膜疾病发病机制中的研究进展. 国际眼科杂志 2008;8(3):575-577
- 9 张兴儒,李青松,许琰,等. 眼结膜松弛的临床分级探讨. 眼科 2001;10(60):361
- 10 李青松,张兴儒,项敏泓,等. 结膜松弛症的治疗研究现状. 国际眼科纵览 2009;33(1):27-30
- 11 张兴儒,李青松,项敏泓. 结膜松弛症的诊断与治疗. 中华眼科杂志 2010;46(1):88-91
- 12 李青松,张兴儒,郑一仁,等. 结膜松弛症定量定位切除术的临床疗效观察. 国际眼科杂志 2010;10(4):683-686
- 13 张兴儒,许琰,刘焯翔. 眼轮匝肌缩短术治疗结膜松弛症. 眼科新进展 2003;23(1):10
- 14 许琰,张兴儒. 四种术式治疗结膜松弛症疗效观察. 眼视光学杂志 2003;5(3):178-180
- 15 Nomura N, Nomura M, Takahira M, *et al*. Phorbol 12-myristate 13-acetate-activated protein kinase C increased migratory activity of subconjunctival fibroblasts via stress-activated protein kinase pathways. *Molecular Vision* 2007;13:2320-2327
- 16 Talbot M, Carrier P, Giasson CJ. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Molecular Vision* 2006;12:65-75
- 17 Product Description of Fibroblast Medium (FM). ScienCell Research Laboratories 2001
- 18 Product Description of Fibroblast Growth Supplement (FGS). ScienCell Research Laboratories 2001
- 19 Product Description of Human Conjunctival Fibroblasts (HConF). ScienCell Research Laboratories 2001
- 20 Jodhbir S. Mehta, Eranga N. Uithana, Divya Venkataraman, *et al*. Analysis of conjunctival fibroblasts from a proband with Schnyder corneal dystrophy. *Mol Vis* 2008;9(14):1277-1281