

· 专家述评 ·

关注泪液蛋白质组学研究在眼表疾病中的临床意义和应用

Zhou Lei 刘丹宁

169856 新加坡眼科研究所 Yong Loo Lin 医学院 新加坡国立大学 DUKE-NUS 医学研究院
(Zhou Lei); 400010 重庆医科大学附属第二医院眼科(刘丹宁)

通信作者: Zhou Lei, Email: zhou.lei@seri.com.sg

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.001

【摘要】 研究显示泪液是一种非常有价值的体液, 可用于眼表疾病的生物标志物的检测。我们系统评述包括干眼、睑缘炎、变态反应性结膜炎、圆锥角膜、感染性角膜炎、结膜松弛症、TAO 等眼表疾病泪液蛋白质的变化, 并分析了糖尿病、眼表外伤及屈光手术后、长期佩戴眼表角膜接触镜、长期局部使用青光眼药物对眼表泪液蛋白质的影响, 希望眼科医师了解泪液蛋白质在各种眼表疾病状况下的特异性变化, 为这些疾病的优化治疗提供有用线索。

【关键词】 泪液; 人; 泪液蛋白质组学; 眼表疾病

Paying attention to proteomics of human tear: clinical significance and application in ocular surface diseases

Zhou Lei, Liu Danning

Singapore Eye Research Institute, Department of Ophthalmology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, DUKE-NUS Graduate Medical School, 169856, Singapore (Zhou L); Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China (Liu DN)

Corresponding author: Zhou Lei, Email: zhou.lei@seri.com.sg

[Abstract] Previous research demonstrated that human tear is a valuable source for biomarker discovery for many ocular surface diseases. Here, we systematically summarized the changes of tear protein profile in many ocular surface diseases, including dry eye, blepharitis, ocular allergy, keratoconus, infectious keratitis, conjunctivochalasis, ocular rosacea, and thyroid-associated ophthalmopathy and other conditions, such as diabetes, ocular surface wounding and refractive surgeries, contact lens wearing, and effects of glaucoma medication on ocular surface, attempting to make ophthalmologists understand the specific changes of tear protein profile in each disease or condition and hold the promise for optimal management of the diseases.

[Key words] Tear; Human; Proteomics; tear; Ocular surface diseases

经过至少 20 年的发展, 蛋白质组学已经成为生命科学进入后基因时代的强有力工具, 蛋白质组学研究能够提供很多基因组学不能提供的有用信息, 如蛋白质的翻译后修饰, 同时也为多种疾病发病机制的研究提供了方法学, 一些疾病的特异性蛋白分子可以成为用于临床诊断的生物标志物或新药开发的分子靶点, 因此蛋白质组学的研究已广泛深入到生命科学和医药学的各个领域。

1 泪液蛋白质组学研究与眼科疾病的关系

近 10 年来, 泪液蛋白质组学的研究取得了长足的

进步, 包括泪液蛋白质组学的分析技术、正常人泪液中的蛋白组分研究以及泪液蛋白质组学研究在眼科疾病诊疗中的应用等^[1]。利用这些研究方法可以比较在不同生理或疾病条件下不同细胞蛋白质在眼部表达的异同, 并对相关蛋白质进行分类和鉴定, 为眼科疾病的诊断和靶向治疗提供有用的信息和依据, 更重要的是可利用蛋白质组学的研究分析不同的眼病发病和进展过程中蛋白质间相互作用和蛋白质的功能变化。

2 泪液蛋白质组学研究在眼科的应用

2.1 干眼的泪液蛋白变化

干眼是指任何原因造成的泪液质或量异常或动力学异常,导致泪膜稳定性下降,并伴有眼部不适和/或眼表组织病变特征的多种疾病的总称,近年来干眼泪液蛋白质组学研究得到广泛开展。Grus 等^[2]通过 SELDI-TOF-MS 检测到干眼患者泪液中炎症相关蛋白 S100 A8 含量明显增加,而具有保护作用的溶菌酶、富含脯氨酸蛋白 3 和脯氨酸蛋白 4,α-1-抗胰蛋白酶含量明显降低。Versura 等^[3]对比蒸发过强型干眼和正常人泪液蛋白质的差异,发现乳铁蛋白、脂质转运蛋白-1 和 lipophilin A-C 含量均降低,清蛋白含量升高,而溶菌酶和锌-α2 糖蛋白含量没有变化,其他研究也证明脂质转运蛋白-1、溶菌酶、催乳素诱导蛋白(prolactin-inducible protein, PIP)、脯氨酸蛋白 4 在干眼泪液中的下调程度与干眼的严重程度呈正相关^[4-5]。Zhou 等^[6]应用 iTRAQ 定量蛋白质组学结合 2 D-nanoLC-MS/MS 方法发现 α-烯醇化酶(α-enolase)、α1 酸性糖蛋白 1、S100 A8、S100 A9、S100 A4 和 S100 A11 等 6 种蛋白含量增加,而 PIP、脂质转运蛋白-1、乳铁蛋白和溶酶菌含量降低,应用 4 种蛋白标志物组合检测干眼的精确度可达到 96%,而 1 种蛋白标志物的检测精确度仅 85%。这种多个蛋白特征性标志物组合诊断干眼的方法综合了泪液分泌不足、眼表炎症及损害、泪液浓度过高等多种因素,提高了干眼的蛋白质组学诊断精确度。

Sjögren 综合征(Sjögren syndrome, SS)是一种全身外分泌腺(如泪腺、唾液腺等)受累的慢性炎症性自身免疫性疾病。与普通干眼相似,SS 中溶菌酶、乳铁蛋白和泪液特异性前清蛋白、脂质转运蛋白-1 均明显降低^[6]。Zhou 等^[7]在兔 SS 模型泪液中发现 S100 A6、S100 A9、血清蛋白表达上调,而血清铁传递蛋白、PIP、多聚免疫球蛋白受体和 Ig γ 链 C 恒定区下调,plgR 仅在 SS 中下调。Li 等^[8]应用 2 D-nano-LC-MS/MS 检测了 SS 患者、干眼患者和正常人泪液蛋白质组学差异,发现 defensin α1、clusterin 和 lactotransferrin 是 SS 特异性蛋白。Hamm-Alvarez 等^[9]在 SS 患者的泪液蛋白标志物筛查研究中发现组织蛋白酶 S 可作为 SS 特征性蛋白标志物,用于临床诊断 SS 的有效补充。大量研究表明干眼患者泪液中存在细胞因子、趋化因子及可溶性受体的改变,Massingale 等^[10]报道了干眼患者泪液中 8 种细胞因子 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IFN-γ、TNF-α 和 IL-1β 和 1 种趋化因子 IL-8 明显增加,Na 等^[11]证实干眼患者泪液中 IL-1β、IL-6、IL-16、IL-33、粒细胞集落刺激因子、TNF-α 含量明显升高,而 IL-4、IL-12、IL-17A 及 IFN-γ 含量降低;趋化因子及可溶性受体包括 CX3CL1、单核细胞趋化蛋白-1、delta 小鼠巨

噬细胞炎性蛋白 1、上皮来源的中性粒细胞活化肽-78、ligand 5、CXCL5、sIL-1RI sgp 130、sIL-6R、可溶性 EGF 受体、可溶性 TNF 受体 2 含量增加,与干眼严重程度呈正相关。应用不含防腐剂的人工泪液治疗后,IL-1β、IL-6、IL-12、TNF-α 含量明显降低,过氧化氢酶、过氧化物酶 2、超氧化物歧化酶 2 和硫氧化还原蛋白含量明显增高,说明不含防腐剂的人工泪液可更有效地减轻眼部炎症,增加泪液的抗氧化成分^[12]。Th 细胞诱导的细胞因子也参与干眼的炎症反应途径,Th2 细胞因子 IL-13 可促进杯状细胞的分化,起到稳态作用;Th1 细胞因子 IFN-γ 可拮抗 IL-13 的功能,促进凋亡和眼表上皮的鳞状上皮化生;Th17 细胞因子 IL-17 可破坏角膜上皮的屏障功能。眼表上皮同时也表达这些因子的相应受体^[13]。SS 患者的泪液中 Th17 诱导的细胞因子如 IL-17、IL-22、IL-21 的含量均高于单纯干眼患者及正常人^[14-15]。

2.2 眼缘炎的泪液蛋白变化

睑缘炎是眼睑睑缘的慢性炎症反应,与多种系统性疾病有关,特别是酒渣鼻和脂溢性皮炎,可导致干眼、睑板腺囊肿、角膜炎等眼部疾病。Koo 等^[16]应用 ESI-MS/MS 方法对睑缘炎患者和正常受检者泪液蛋白成分进行比较,发现睑缘炎泪液中清蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、催泪蛋白、溶菌酶、Ig-κ 链 VIII、PIP、半胱氨酸蛋白酶(cystatin protease, CSTP)抑制剂-SA III、丙酮酸激酶和未标记蛋白等 9 种泪液蛋白明显降低,由于睑缘炎导致干眼,泪液中某些泪腺分泌蛋白水平也明显降低。睑板腺分泌功能与睑缘炎密切相关,Soria 等^[17]在睑板腺功能障碍伴干眼的泪液中发现 S100 A6、膜联蛋白 A1、膜联蛋白 A11、CSTP 抑制剂 S 和磷脂酶 A2 激活蛋白在睑板腺功能障碍伴干眼患者的泪液中表达特异性增高,可作为蛋白标志物,用于对睑板腺功能障碍伴干眼患者与单纯干眼患者和正常人进行鉴别。

2.3 变态反应性结膜炎的泪液蛋白变化

变态反应性结膜炎按发病时期分为季节性变态反应性结膜炎(seasonal allergic conjunctivitis, SAC)和常年变态反应性结膜炎;按形态学改变分为春季卡他性结膜炎(vernal catarrh conjunctivitis, VKC)、特应性角结膜炎(atopic keratoconjunctivitis, AKC)和巨乳头性结膜炎(giant papillary conjunctivitis, GPC)。变态反应性结膜炎泪液中 IgE 水平明显高于非变态反应性结膜炎^[18],但 IgE 水平的改变并非变态反应性结膜炎的特异表现。泪液中更多的炎症相关因子如组胺、类胰蛋白酶、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白、IL-4、IL-5 和嗜酸性粒细胞趋化因子检测可用于变态反应性结膜炎的诊

断^[19]。Leonardi 等^[20]应用 iTRAQ 定量蛋白质组学技术证实 VKC 患者泪液中血红素结合蛋白、转铁蛋白、乳腺珠蛋白 B、分泌球蛋白 1D 过表达,且环孢素滴眼液或糖皮质激素滴眼液治疗使这些蛋白水平明显下调。嗜酸性粒细胞释放的蛋白和因子的毒性反应可导致 VKC 患者发生角膜并发症,其泪液中 MMP-1、MMP-9 水平和活性明显增加,MMP-1/TIMP-1 和 MMP-9/TIMP-1 比值增加^[21],抗体芯片技术检测也发现 MMP-2、MMP-3、MMP-8 和 MMP-10 在泪液中也明显增多^[22],认为 MMPs 和其抑制剂的失衡参与 VKC 眼表炎症细胞的移行及组织重构,导致角膜损害。Hida 等^[23]应用 SELDI 技术进行研究,发现伴有角膜损害的 AKC 患者泪液中 α -防御素含量明显高于不伴有角膜损害的 AKC 患者及正常对照者。变态反应性结膜炎泪液细胞因子、趋化因子、生长因子、血管发生因子、酶及抑制剂的研究得到深入开展,发现不同亚型的眼变态反应性疾病其泪液细胞因子/趋化因子不同。SAC 患者泪液中仅 IL-1b 水平明显升高,而 GPC 患者泪液中 IL-8 水平明显升高^[24]。VKC 患者中 Th1 细胞因子(IL-2 和核因子-g)、Th2 细胞因子(TNF- α 、IL-4、IL-5 和 IL-13)的表达量较正常对照者增加,一些研究还提示 VKC 患者比 AKC 患者泪液中存在更多的 Th2 炎症因子、血管因子和生长因子^[22]。

2.4 圆锥角膜的泪液蛋白变化

圆锥角膜是一种发生在青年人的原发性角膜膨隆,主要表现为角膜基质变薄、角膜呈圆锥形膨出,从而导致不规则散光和/或近视。圆锥角膜患者泪液中的炎症因子增多,说明圆锥角膜与慢性炎症有关。圆锥角膜患者泪液中 IL-6、TNF- α 、MMP-9 表达明显增多,同时对侧健眼泪液中 IL-6、TNF- α 也呈高表达^[25]。Pannebaker 等^[26]应用细胞因子抗体芯片和 1 D-SDS-PAGE-MS 检测了圆锥角膜患者和正常对照者泪液中的差异蛋白,发现圆锥角膜者泪液中 MMP-1 增多,角蛋白和乳腺珠蛋白 B 存在差异表达。Lema 等^[27]进一步证明圆锥角膜患者泪液中锌- α -2-糖蛋白、乳铁蛋白、免疫球蛋白-k 链表达量下降,还有研究表明乳铁蛋白、SIgA 含量降低且与角膜曲率呈负相关,在佩戴角膜接触镜后无改善^[28]。圆锥角膜患者泪液中巨囊性疾病液状蛋白(gross cystic disease fluid protein-15, GCDFP-15)或 PIP 可能成为圆锥角膜特征性蛋白标志物,其泪液中 GCDFP-15/PIP 明显高于正常人,且与 PIP 结合的锌- α -2-糖蛋白 1 也明显上调,说明 GCDFP-15/PIP-AZGP1 相互作用可能是圆锥角膜发病机制之一。圆锥角膜患者泪液中蛋白酶变化参与其病理改

变,组织蛋白酶 B 水平上调,多聚体免疫球蛋白受体、纤维蛋白原 α 链、CSTP 抑制剂 S 和 SN 含量降低。角蛋白-1-细胞支架 14 和角蛋白-2-细胞支架 5 仅在圆锥角膜患者泪液中表达^[29]。

2.5 感染性角膜炎的泪液蛋白变化

感染性角膜炎是由病原微生物感染角膜而引起的角膜炎症,微生物因素和宿主因素共同导致感染性角膜炎的发生和发展^[30]。泪液中含有许多抗微生物蛋白/肽类,在眼表中起到重要的预防感染作用。Lomholt 等^[31]发现绿脓杆菌性角膜炎患者的泪液中 sIgA 出现降解,绿脓杆菌释放多种酶类降解 sIgA,使得眼表免疫防护机制降低。Ananthi 等^[32]应用 2 D-gel-MALDI-TOF-MS 技术检测了真菌性角膜炎的泪液蛋白,发现谷氨酰蛋白相关蛋白仅存在于曲霉菌感染和镰刀菌感染性角膜炎泪液样本中。因此谷氨酰蛋白相关蛋白可能是氧化应激条件下出现的一种真菌蛋白。在感染性泪液样本中,CSTP 抑制剂含量降低,如 CSTP 抑制剂 S 前体蛋白、CSTP 抑制剂 SN 前体蛋白、CSTP 抑制剂和脂质运载蛋白,而 PIP 和血清蛋白含量增多。CSTP 抑制剂通过调控内源性半胱氨酸水解酶活性来降低蛋白水解和组织损害,这些泪液蛋白的分析为感染性角膜炎的病理机制研究及早期临床治疗提供了依据。Ananthi 等^[33]进一步证明在镰刀菌感染的角膜炎泪液中存在多种蛋白表达的改变,包括 α 1-胰蛋白酶抑制剂、触珠蛋白 α 2 链、锌- α -2-糖蛋白、血清载脂蛋白、清蛋白、触珠蛋白前体- β 链、乳铁蛋白、泪液脂质转运蛋白前体、CSTP 抑制剂 SA III 前体蛋白和 lacritin 前体蛋白,可能参与真菌性角膜炎的发生和发展。

2.6 结膜松弛症的泪液蛋白变化

结膜松弛症是由于下方球结膜松弛堆积而表现出眼表刺激症状、干眼、溢泪等,常伴有眼表的慢性炎症。研究表明,结膜松弛症患者泪液中的前炎症因子 IL-6 和 IL-8 水平增加,且其增加水平与疾病的严重程度密切相关^[34]。Acera 等^[35]发现结膜松弛症患者泪液中 S100 A4、S100 A8、S100 A9、鸟氨酸结合蛋白 2、L-乳酸脱氢酶 A-like 6B、脂肪酸结合蛋白、角蛋白 I 细胞骨架 10、谷胱甘肽-S-转移酶-P、过氧化物氧化酶-1、过氧化物氧化酶-5 和 cullin-4 B + glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 等 11 种蛋白含量增加,其中 S100 A8 和 S100 A9 是前炎性相关蛋白。

2.7 糖尿病患者的泪液蛋白变化

糖尿病是全身系统性疾病,可在眼部出现多种并发症。Li 等^[8]应用 2 D-LC-MS/MS 方法对比了 2 型糖尿病患者伴干眼组和不伴干眼组泪液差异蛋白,发现

伴有干眼的糖尿病患者泪液中凋亡相关蛋白如 annexin A1, 免疫及炎症相关蛋白如中性粒细胞弹性蛋白酶 2、凝聚素、糖代谢相关蛋白如载脂蛋白 A-II 表达增多。DR 泪液蛋白存在明显的变化, Kim 等^[36] 应用 ESI-Q-TOF MS/MS 发现早期 DR 患者泪液中蛋白表达改变早于视网膜的临床形态学改变, LCN-1、热休克蛋白 27(heat shock protein 27, HSP27) 和 B2M 在 DR 患者泪液中表达降低。Csosz 等^[37] 应用 iTRAQ-nano HPLC 联合 ESI-MS/MS 发现 DR 患者泪液中脂质运载蛋白 1、乳运载蛋白、催泪蛋白、溶菌酶 C、亲脂素 A 和免疫球蛋白 λ 链较正常人明显增高。DR 泪液中这些蛋白可能成为 DR 的特征性蛋白。

2.8 TAO 的泪液蛋白变化

TAO 又称 Graves 眼病, 是甲状腺功能亢进的眼部表现, 常并发泪腺肥大和干眼等^[38]。Baker 等^[39] 应用 MALDI-TOF-MS 检测到 TAO 患者泪液中锌-α-2-糖蛋白和乳铁蛋白含量均增加。Okrojek 等^[40] 应用 SELDI-TOF 检测到相对分子质量为 3 300~4 300 的一个降低的蛋白峰, 但没有明确的蛋白鉴定结果。Yoon 等^[41] 观察了 TAO 患者泪液中神经生长因子(nerve growth factor, NGF) 含量明显升高, 经过糖皮质激素治疗后 2~4 周则明显降低。Jiang 等^[42] 证明 TAO 患者泪液中炎症相关蛋白免疫球蛋白的链 C 区(IgκC) 和清蛋白明显降低, 且存在于正常人泪液中的补体 C3 在 TAO 患者的泪液中缺失。

2.9 眼表外伤及屈光手术后泪液蛋白变化

眼表损伤修复是角膜上皮细胞、基质成纤维细胞、神经细胞、泪腺、炎性细胞细胞外基质的共同参与的过程, 在眼表外伤中, 泪液蛋白存在明显的改变。LC-MS 分析显示, 在兔眼损伤后第 1 天损伤眼泪液中溶菌酶含量是非损伤眼的 8 倍^[43]。泪液中防御素的水平与角膜伤口愈合过程密切相关, 是机体免疫系统的重要组成部分^[44]。眼表创伤后泪液中天然的抗微生物蛋白/肽类水平上调。研究证明, 眼表手术后人 α-防御素(HNP-1、HNP-2 和 HNP-3) 明显上调, 术后第 3 天 HNP-1 和 HNP-2 已经达到治疗水平, 伤口完全愈合后恢复到正常水平^[45]。防御素具有光谱抗菌活性, 能够积极地影响角膜伤口愈合过程^[46], 炎症反应开始时 defensin 快速下降, 说明防御素不能消除炎症反应^[47]。

屈光手术后患者的泪液蛋白也存在炎症相关性改变。泪液中 TGF-β1 水平与角膜 haze 相关, epi-LASIK 角膜 haze 少于 LASEK 和 PRK, 因此 epi-LASIK 术后患者泪液 TGF-β1 水平也明显低于 LASEK 和 PRK^[48]。NGF 可刺激神经生长, 在 PRK 和 LASIK 术后患者泪

液中表达上调, 且术后 1 个月 PRK 组患者泪液中 NGF 含量高于 LASIK 组^[49]。另外, 纤溶酶原激活物抑制剂 PAI-2 在 PRK 和 LASIK 术后泪液中也被发现, 说明在屈光术后眼表损伤存在酶反应^[50]。飞秒激光屈光手术能够降低对眼表的影响, D'Souza 等^[51] 对比了 Visumax 和飞秒 2 种飞秒激光对泪液的影响, 发现术后 3 个月后 Visumax 激光组的溶菌酶、乳铁蛋白、LCN-1 等典型的泪腺分泌蛋白的含量高于飞秒激光组, 且已经接近术前水平, 说明使用 Visumax 激光术患者的泪液分泌功能恢复较快。

2.10 长期佩戴角膜接触镜后泪液蛋白变化

角膜接触镜作为眼表异物对眼表泪液及角膜上皮具有一定的影响。佩戴角膜接触镜后泪液中乳铁蛋白、sIgA、溶菌酶、清蛋白明显降低, 脂质转运蛋白含量则增高。Kramann 等^[52] 应用 SELDI-TOF 方法检测了佩戴软性接触镜、硬性透气性接触镜和未戴镜患者泪液蛋白成分, 发现 S100 A8 在软性接触镜佩戴者泪液中含量增加, 而在硬性透气性接触镜佩戴者中 CSTP 抑制剂含量增加, secretoglobin 含量降低, 在硬性接触镜佩戴和软性接触镜佩戴者 2 个组中泪液溶菌酶含量均降低。Funke 等^[53] 应用 RP-RP-Capillary-HPLC-MALDI TOF/TOF MS 方法发现了一个与牛磺酸反应相关的蛋白亚类, 在应用牛磺酸滴眼液点眼后明显降低。

2.11 长期局部使用青光眼药物对眼表泪液蛋白的影响

局部使用降眼压药物是治疗青光眼的有效手段, 但长期应用对眼表存在一定损害。Malvitte 等^[54] 对持续应用抗青光眼药物 6 个月以上的 21 例患者进行泪液分析, 发现了 21 种细胞因子的改变。其中 IL-1b、IL-6、IL-12 和 TNFa 等前炎症因子明显增加, 同时 Th1/Th2 细胞因子比率增高, 说明 Th1 炎症反应占主导地位, 泪液中趋化因子 IL-8 和 MCP1 较未点眼药组增多。另一研究对含 BAK 防腐剂的拉坦前列素 1 个月后患者的结膜进行分析发现 MMP-9/TIMP-2 增加, 两者间的失衡可能增加眼表基质损害的风险^[55]。Wong 等^[56] 应用 LC-MS/MS 方法对长期应用抗青光眼药物的泪液进行分析发现 S100 A8、S100 A9、乳腺珠蛋白 B 较未点眼者明显增加, 持续用药 1 年以上者这 4 种蛋白水平明显高于用药不足 1 年组, 因此局部应用抗青光眼药物可明显增加眼表炎症反应的风险。

3 泪液蛋白组学研究的注意事项

为了能得到有意义的结果, 泪液的蛋白组学分析

必须注意以下几个方面:(1)为了使最终结果有统计意义,研究时收集的样本数量需达到一定要求,实验设计中须考虑生物学重复和技术重复问题。(2)年龄、性别、病史、用药情况等对泪液的成分都有一定影响,实验设计须考虑这些因素。(3)样本采集的方法应该尽量避免收集反射性分泌的泪液。(4)规范采样、样本保存、样本制备等一切实验程序。泪液或许是可以采样的人类体液中体积最小的组织液(通常只有几毫升),给分析带来了一定的挑战,但是作为一种可以进行无创采集的体液,未来还是有非常广阔的应用前景,希望眼科医师关注相关的研究过程和进展,更好地为眼病的临床诊疗服务。

参考文献

- [1] Zhou L, Liu DN. Attention and understanding of tear protein research and its clinical significance [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(5): 385–388. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.001.
- [2] Zhou L, Liu DN. Proteomics of human tears: towards clinical applications [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(5): 385–388. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.001.
- [3] Grus FH, Podust VN, Bruns K, et al. SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(3): 863–876. DOI: 10.1167/ivs.04-0448.
- [4] Versura P, Nanni P, Bavelloni A, et al. Tear proteomics in evaporative dry eye disease [J]. Eye (Lond), 2010, 24(8): 1396–1402. DOI: 10.1038/eye.2010.7.
- [5] Srinivasan S, Thangavelu M, Zhang L, et al. iTRAQ quantitative proteomics in the analysis of tears in dry eye patients [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(8): 5052–5059. DOI: 10.1167/ivs.11-9022.
- [6] Aluru SV, Agarwal S, Srinivasan BS, et al. Lacrimal proline rich 4 (LPRR4) protein in the tear fluid is a potential biomarker of dry eye syndrome [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(12): e51979 [2015-03-19]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0051979>. DOI: 10.1371/journal.pone.0051979.
- [7] Zhou L, Beuerman RW, Chan CM, et al. Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics [J]. J Proteome Res, 2009, 8(11): 4889–4905. DOI: 10.1021/pr900686s.
- [8] Zhou L, Wei R, Zhao P, et al. Proteomic analysis revealed the altered tear protein profile in a rabbit model of Sjögren's syndrome-associated dry eye [J]. Proteomics, 2013, 13(16): 2469–2481. DOI: 10.1002/pmic.201200230.
- [9] Li B, Sheng M, Li J, et al. Tear proteomic analysis of Sjögren syndrome patients with dry eye syndrome by two-dimensional-nano-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J/OL]. Sci Rep, 2014, 4: 5772 [2015-10-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4145314>. DOI: 10.1038/srep05772.
- [10] Hamm-Alvarez SF, Janga SR, Edman MC, et al. Tear cathepsin S as a candidate biomarker for Sjögren's syndrome [J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(7): 1872–1881. DOI: 10.1002/art.38633.
- [11] Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, et al. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients [J]. Cornea, 2009, 28(9): 1023–1027. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181a16578.
- [12] Na KS, Mok JW, Kim JY, et al. Correlations between tear cytokines, chemokines, and soluble receptors and clinical severity of dry eye disease [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(9): 5443–5450. DOI: 10.1167/ivs.11-9417.
- [13] Pflugfelder SC, Corrales RM, de Paiva CS, et al. T helper cytokines in tears of patients with dry eye syndrome treated with preservative-free versus preserved eye drops [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(8): 5081–5089. DOI: 10.1167/ivs.14-14483.
- [14] Tan X, Sun S, Liu Y, et al. Analysis of Th17-associated cytokines in tears of patients with dry eye syndrome [J]. Eye (Lond), 2014, 28(5): 608–613. DOI: 10.1038/eye.2014.38.
- [15] Lim SA, Nam DH, Lee JH, et al. Association of IL-21 cytokine with severity of primary Sjögren syndrome dry eye [J]. Cornea, 2015, 34(3): 248–252. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000363.
- [16] Koo BS, Lee DY, Ha HS, et al. Comparative analysis of the tear protein expression in blepharitis patients using two-dimensional electrophoresis [J]. J Proteome Res, 2005, 4(3): 719–724. DOI: 10.1021/pr0498133.
- [17] Soria J, Duran JA, Etxebarria J, et al. Tear proteome and protein network analyses reveal a novel pentamarker panel for tear film characterization in dry eye and meibomian gland dysfunction [J]. J Proteomics, 2013, 78: 94–112. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.11.017.
- [18] Inada N, Shoji J, Kato H, et al. Clinical evaluation of total IgE in tears of patients with allergic conjunctivitis disease using a novel application of the munochromatography method [J]. Allergol Int, 2009, 58(4): 585–589. DOI: 10.2332/allergolint.09-OA-0101.
- [19] Leonardi A. Allergy and allergic mediators in tears [J]. Exp Eye Res, 2013, 117: 106–117. DOI: 10.1016/j.exer.2013.07.019.
- [20] Leonardi A, Palmigiano A, Mazzola EA, et al. Identification of human tear fluid biomarkers in vernal keratoconjunctivitis using iTRAQ quantitative proteomics [J]. Allergy, 2014, 69(2): 254–260. DOI: 10.1111/all.12331.
- [21] Leonardi A, Brun P, Abatangelo G, et al. Tear levels and activity of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 in vernal keratoconjunctivitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(7): 3052–3058. DOI: 10.1167/ivs.02-0766.
- [22] Leonardi A, Sathe S, Bortolotti M, et al. Cytokines, matrix metalloproteases, angiogenic and growth factors in tears of normal subjects and vernal keratoconjunctivitis patients [J]. Allergy, 2009, 64(5): 710–717. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01858.x.
- [23] Hida RY, Ohashi Y, Takano Y, et al. Elevated levels of human α-defensin in tears of patients with allergic conjunctival disease complicated by corneal lesions: detection by SELDI Protein Chip system and quantification [J]. Curr Eye Res, 2005, 30(9): 737–744. DOI: 10.1080/02713680591005986.
- [24] Cook EB. Tear cytokines in acute and chronic ocular allergic inflammation [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004, 4(5): 441–445.
- [25] Lema I, Sobrino T, Duran JA. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears [J]. Br J Ophthalmol, 2009, 93(6): 820–824. DOI: 10.1136/bjo.2008.144253.
- [26] Pannebaker C, Chandler HL, Nichols JJ. Tear proteomics in keratoconus [J]. Mol Vis, 2010, 16: 1949–1957.
- [27] Lema I, Brea D, Rodriguez-Gonzalez R, et al. Proteomic analysis of the tear film in patients with keratoconus [J]. Mol Vis, 2010, 16: 2055–2061.
- [28] Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Levels of lactoferrin, secretory IgA and serum albumin in the tear film of people with keratoconus [J]. Exp Eye Res, 2012, 96(1): 132–137. DOI: 10.1016/j.exer.2011.12.010.
- [29] Balasubramanian SA, Wasinger VC, Pye DC, et al. Preliminary identification of differentially expressed tear proteins in keratoconus [J]. Mol Vis, 2013, 19: 2124–2134.
- [30] Thomas PA, Geraldine P. Infectious keratitis [J]. Curr Opin Infect Dis, 2007, 20(20): 129–141.
- [31] Lomholt JA, Kilian M. Degradation of uniquely glycosylated secretory immunoglobulin a in tears from patients with *Pseudomonas aeruginosa* keratitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(11): 4939–4944. DOI: 10.1167/ivs.07-1198.

- [32] Ananthi S, Chitra T, Bini R, et al. Comparative analysis of the tear protein profile in mycotic keratitis patients [J]. Mol Vis, 2008, 14: 500–507.
- [33] Ananthi S, Venkatesh Prajna N, Lalitha P, et al. Pathogen induced changes in the protein profile of human tears from Fusarium keratitis patients [J/OL]. PLoS One, 2013, 8 (1) : e53018 [2015-01-25]. http://journals.plos.org/plosone/article? id=10.1371/journal.pone.0053018. DOI:10.1371/journal.pone.0053018.
- [34] Erdogan-Poyraz C, Mocan MC, Bozkurt B, et al. Elevated tear interleukin-6 and interleukin-8 levels in patients with conjunctivochalasis [J]. Cornea, 2009, 28 (2) : 189–193. DOI:10.1097/ICO.0b013e3181861d0c.
- [35] Acer A, Suarez T, Rodriguez-Agirretxe I, et al. Changes in tear protein profile in patients with conjunctivochalasis [J]. Cornea, 2011, 30 (1) : 42–49. DOI:10.1097/ICO.0b013e3181dea7d7.
- [36] Kim HJ, Kim PK, Yoo HS, et al. Comparison of tear proteins between healthy and early diabetic retinopathy patients [J]. Clin Biochem, 2012, 45 (1-2) : 60–67. DOI:10.1016/j.clinbiochem.2011.10.006.
- [37] Csosz E, Boross P, Csutak A, et al. Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy [J]. J Proteomics, 2012, 75 (7) : 2196–2204. DOI:10.1016/j.jprot.2012.01.019.
- [38] Versura P, Campos EC. The ocular surface in thyroid diseases [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2010, 10 (5) : 486–492. DOI:10.1097/ACI.0b013e32833e1749.
- [39] Baker GR, Morton M, Rajapaska RS, et al. Altered tear composition in smokers and patients with graves ophthalmopathy [J]. Arch Ophthalmol, 2006, 124 (10) : 1451–1456. DOI:10.1001/archophth.124.10.1451.
- [40] Okrojek R, Grus FH, Matheis N, et al. Proteomics in autoimmune thyroid eye disease [J]. Horm Metab Res, 2009, 41 (6) : 465–470. DOI:10.1055/s-0029-1214413.
- [41] Yoon JS, Choi SH, Lee JH, et al. Ocular surface inflammation and nerve growth factor level in tears in active thyroid-associated ophthalmopathy [J]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 2010, 248 (2) : 271–276. DOI:10.1007/s00417-009-1215-2.
- [42] Jiang LH, Wei RL. Analysis of Graves' ophthalmopathy patients' tear protein spectrum [J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126 (23) : 4493–4498.
- [43] Zhou L, Beuerman RW, Barathi A, et al. Analysis of rabbit tear proteins by high-pressure liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17 (5) : 401–412.
- [44] Zhou L, Beuerman RW, Huang L, et al. Proteomic analysis of rabbit tear fluid: defensin levels after an experimental corneal wound are correlated to wound closure [J]. Proteomics, 2007, 7 : 3194–3206. DOI:10.1002/ rcm.925.
- [45] Zhou L, Huang LQ, Beuerman RW, et al. Proteomic analysis of human tears: defensin expression after ocular surface surgery [J]. J Proteome Res, 2004, 3 (3) : 410–416.
- [46] McDermott AM. The role of antimicrobial peptides at the ocular surface [J]. Ocul Surf, 2004, 2 (4) : 229–247.
- [47] Li J, Raghunath M, Tan D, et al. Defensins HNP1 and HBD2 stimulation of wound-associated responses in human conjunctival fibroblasts [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47 (9) : 3811–3819. DOI:10.1167/iovs.05-1360.
- [48] Long Q, Chu R, Zhou X, et al. Correlation between TGF-beta1 in tears and corneal haze following LASEK and epi-LASIK [J]. J Refract Surg, 2006, 22 (7) : 708–712.
- [49] Lee HK, Lee KS, Kim HC, et al. Nerve growth factor concentration and implications in photorefractive keratectomy vs laser in situ keratomileusis [J]. Am J Ophthalmol, 2004, 139 (6) : 965–971.
- [50] Csutak A, Silver DM, Tozser J, et al. Plasminogen activator inhibitor in human tears after laser refractive surgery [J]. J Cataract Refract Surg, 2008, 34 (6) : 897–901. DOI:10.1016/j.jcrs.2008.02.024.
- [51] D'Souza S, Petznick A, Tong L, et al. Comparative analysis of two femtosecond LASIK platforms using iTRAQ quantitative proteomics [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55 (6) : 3396–3402. DOI:10.1167/iovs.14-14113.
- [52] Kramann C, Boehm N, Lorenz K, et al. Effect of contact lenses on the protein composition in tear film: a ProteinChip study [J]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 2011, 249 (2) : 233–243. DOI:10.1007/s00417-010-1456-0.
- [53] Funke S, Azimi D, Wolters D, et al. Longitudinal analysis of taurine induced effects on the tear proteome of contact lens wearers and dry eye patients using a RP-RP-Capillary-HPLC-MALDI TOF/TOF MS approach [J]. J Proteomics, 2012, 75 (11) : 3177–3190. DOI:10.1016/j.jprot.2012.03.018.
- [54] Malvitte L, Montange T, Vejux A, et al. Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs [J]. Br J Ophthalmol, 2007, 91 (1) : 29–32.
- [55] Chong RS, Jiang YZ, Boey PY, et al. Tear cytokine profile in medicated glaucoma patients: effect of monocyte chemoattractant protein 1 on early posttrabeculectomy outcome [J]. Ophthalmology, 2010, 117 (12) : 2353–2358. DOI:10.1016/j.ophtha.2010.03.064.
- [56] Wong TT, Zhou L, Li J, et al. Proteomic profiling of inflammatory signaling molecules in the tears of patients on chronic glaucoma medication [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52 (10) : 7385–7391. DOI:10.1167/iovs.10-6532.

(收稿日期:2015-12-20)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

本刊投稿方式

投稿请登陆中华医学会网站 (<http://www.cma.org.cn>)，登录后点击“业务中心”，经中华医学会远程稿件处理系统 (<http://www.cma.org.cn/ywzx/index.html>) 或中华医学会杂志社网站 (<http://www.medline.org.cn/>)，根据提示进行注册后投稿。投稿时请使用 Word 格式 (.doc 文件类型)，投稿后请注意自留原稿，并保留论文相关的原始资料，以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”，填写有关项目并请每位作者亲笔签字，加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部，其中作者签名顺序和作者单位著录名称应与投稿时文章中著录的相一致，如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意：(1)在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投，但投稿时应向编辑部说明，非中文文字期刊已发表的文稿须征得首次发表期刊的同意。(2)作者须告知与该研究有关的利益冲突，如该研究被某机构资助的声明或与审稿人的利益关系。(3)如涉及保密问题，需附有关部门审查同意发表的证明。

(本刊编辑部)