

玻璃体视网膜疾病的玻璃体蛋白质组学研究进展

宋珮璐 综述 汪枫桦 审校

上海交通大学附属第一人民医院眼科 上海市眼底病重点实验室 上海眼视觉与光医学工程技术研究中心 200080

通信作者:汪枫桦, Email: shretina@sjtu.edu.cn

【摘要】 玻璃体是凝胶状、透明且高度水合的基质。玻璃体中存在着许多影响视网膜生理功能的蛋白质,玻璃体内蛋白质组成在多种玻璃体视网膜疾病中发生特征性改变。因此,对玻璃体内蛋白进行蛋白质组学研究是了解玻璃体视网膜疾病病理生理机制、发现生物标志物和药物靶点的有效途径。近十年来,多种蛋白质组学方法逐渐应用于玻璃体的整体性蛋白质组研究,糖尿病视网膜病变、黄斑前膜、孔源性视网膜脱离等许多玻璃体视网膜疾病的玻璃体蛋白图谱初步建立,并发现了一些潜在的生物靶点。本文就蛋白质组学方法、玻璃体蛋白质组学在玻璃体视网膜疾病中的应用进展进行综述。

【关键词】 玻璃体; 蛋白质组学; 糖尿病视网膜病变; 黄斑前膜; 视网膜脱离

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.016

Advances in vitreous proteomics of vitreoretinal diseases

Song Minlu, Wang Fenghua

Department of Ophthalmology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Ocular Fundus Disease, Shanghai Engineering Center for Visual Science and Photomedicine, Shanghai 200080, China

Corresponding author: Wang Fenghua, Email: shretina@sjtu.edu.cn

【Abstract】 Vitreous is a gelatinous, transparent, highly hydrated matrix that fills the posterior segment of eye. A diversity of proteins that can influence retinal physiology are present in vitreous. Moreover, the protein composition of vitreous alters in a number of vitreoretinal disease states. Therefore, analysis of protein composition in vitreous is an effective way to understand the pathophysiological mechanisms of vitreoretinal diseases and to discover biomarkers or treatment targets. Various proteomic methods have been gradually applied to the study of vitreous proteomics. Attempts aiming to establish a map of vitreous proteins for vitreoretinal diseases, such as diabetic retinopathy, epiretinal membranes, rhegmatogenous retinal detachment were performed over the last decade, some potential biomarkers have been discovered. This article reviewed the approaches of proteomics and advances in the study of vitreous proteomics of vitreoretinal diseases.

【Key words】 Vitreous; Proteomics; Diabetic retinopathy; Epiretinal membrane; Retinal detachment

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.016

玻璃体位于眼球后段晶状体和视网膜之间,占眼球体积的80%,呈透明、高度水合的凝胶状态^[1],其98%的成分是水,其他成分包括胶原蛋白、透明质酸、蛋白聚糖及少量玻璃体细胞等。正常玻璃体内蛋白质含量平均为0.5 mg/ml^[2],包含大量白蛋白、免疫球蛋白及许多功能尚不完全清楚的低丰度蛋白^[1]。众所周知,玻璃体与许多玻璃体视网膜疾病的发病密切相关,如玻璃体视网膜牵引是黄斑裂孔、视网膜脱离、增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)、增生性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)等病变的基础。由于玻璃体与视网膜紧密相邻,且视网膜血管对玻璃体起到营养作用,因此玻璃体内的蛋白成分会受视网膜生理及

病理状态的影响而发生改变^[3],对玻璃体内蛋白进行分析是了解玻璃体视网膜疾病病理生理机制的有效途径。通过ELISA、Western blot等方法可以对玻璃体内蛋白成分进行分析,但无法获得整体性蛋白质表达信息,限制了对病理状态下蛋白功能网络变化的了解。蛋白质组学是研究特定状态下细胞、组织或体液中的蛋白质组成、表达水平和相互作用的学科。通过对生理及病理状态下蛋白质进行比较分析,蛋白质组学研究可以提供细胞生物化学途径中蛋白质表达、疾病的发病机制和药物干预造成的蛋白质改变等多种信息,因而被广泛应用于多种疾病的发病机制、早期诊断、药物治疗靶点等方面的研究。泪液、房水、晶状体等均可作为蛋白质组学分析的样本,在干眼、青光

眼、白内障的研究中应用广泛^[4-6]。玻璃体中蛋白成分相对简单,更易发现低丰度蛋白表达的细微变化,是蛋白质组学研究的理想材料^[7]。近年来,以玻璃体为样品的定性和定量蛋白质组学研究逐渐开展,通过分析玻璃体视网膜疾病中的玻璃体蛋白质组成,为进一步了解眼底疾病的发病机制、发现潜在的生物标志物或药物靶点提供实验依据。本文将对玻璃体蛋白质组学技术进展及多种玻璃体视网膜疾病的玻璃体蛋白质组学研究现状进行综述。

1 玻璃体蛋白质组学

1.1 蛋白质组学基本流程

蛋白质组学是一个多步骤且不唯一的过程,通常包括样本获取、样本制备及蛋白酶解、蛋白质/多肽的分离、质谱鉴定和数据分析等。因研究设计、蛋白质组学技术及质谱仪的不同,蛋白质组学的具体过程也各不相同。

1.1.1 样本获取 正常人眼玻璃体通常只能从尸眼中获取,但蛋白降解和血-视网膜屏障的破坏会造成玻璃体蛋白质成分发生改变^[8]。玻璃体切割术是获取玻璃体样本常用的方法,同时也是视网膜脱离、PVR、PDR、黄斑裂孔等玻璃体视网膜疾病手术治疗的主要手段。通常认为特发性黄斑裂孔患者的玻璃体内生物化学指标及蛋白未受明显改变,因而很多研究将其作为“正常”对照^[9-11]。

玻璃体切割术中通常可得到 0.5 ~ 1.0 ml 未稀释玻璃体样本。得到的玻璃体样本应立即在液氮中冷冻并置于 -80 °C 中保存备用。Mandal 等^[12]建议在样本中添加蛋白酶抑制剂后储存。

1.1.2 样本制备 为了能更好地检测低丰度蛋白、简化复杂的蛋白质混合物,对玻璃体样品的处理通常包括蛋白质的浓缩提纯、变性裂解等。离心法常用去除玻璃体样本中的细胞成分,通常是 4 °C 条件下,12 000 ~ 16 000 × g,离心 5 ~ 10 min^[13]。玻璃体样本中含有大量的白蛋白和免疫球蛋白 G,可能影响疾病相关低丰度蛋白的检测,常用亲和色谱法、免疫亲和分离、丙酮沉淀等方法去除高丰度蛋白,但同时也会造成部分低丰度蛋白的丢失^[10]。

1.1.3 蛋白质/多肽分离 将样本进行分离的方法主要包括基于电泳技术的蛋白质分离和基于液相色谱(liquid chromatography, LC)技术的多肽分离。

双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2D-PAGE)是传统的蛋白质组学分离技术,基于等电点和相对分子质量的双向分离,蛋白质得以分离并在染色后实现可视化和定量化。通过对吸光度的比较分析可帮助寻找差异表达的蛋白,蛋白经胰蛋白酶分解为多肽后即可进行下一步的鉴定。双向荧光差异凝胶电泳(two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)技术中蛋白质的分离也采用相同的原理,该技术中蛋白质在电泳前被荧光染料标记,并引入内标来减少误差,具有比 2D-PAGE 更高的灵敏度和分辨率,能实现更精确的定量分析。

许多定量蛋白质组学技术,如 Label-free、同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification,

iTRAQ)等是直接对多肽进行分离。在 LC 系统中,肽段根据疏水性进一步分离,来减少一定时间内进入质谱仪的多肽数量,增加分离的次数可以使得样品的复杂性降低。

1.1.4 质谱鉴定 质谱技术是蛋白质组学研究中主要的鉴定方法。肽段进入质谱仪前需要先进行气相离子化,基质辅助激光解吸电离(matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)和电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)是 2 种主要的离子化方法。虽然质谱仪有多种,但其核心均是测定肽离子的质荷比,得到质谱图谱。串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)能够进一步裂解特定肽获得部分氨基酸序列信息,提高精确度。

1.1.5 数据分析 在数据库中检索质谱图谱可实现蛋白质鉴定,经多种定量技术对蛋白质进行定量比较后寻找差异表达的蛋白质。通过多种生物信息学分析可以了解蛋白质的功能、定位、生物化学途径等,寻找其与疾病病理进程之间的联系。

1.2 常用的蛋白质组学技术

1.2.1 双向凝胶电泳 2D-PAGE 和 2D-DIGE 的共同优点是定量基于蛋白水平。此外,2D 凝胶能够显示在多肽水平难以研究的翻译后修饰蛋白^[13]。同时,它们也存在对低丰度蛋白的不敏感以及极端相对分子质量蛋白漏检、样品处理复杂、难以自动化等局限。

1.2.2 Label-free 定量蛋白质组学 Label-free 定量即非标记的定量蛋白质组学,无需对样本做特定标记,通过比较样品间特定肽段的质谱信号强度即可得到样品间蛋白表达量的差异,操作简单,但准确性较标记定量差。Label-free 定量在玻璃体蛋白质组学中的应用较为广泛,在多种玻璃体视网膜疾病的蛋白质组学研究中均有报道^[8,14-15]。

1.2.3 标记定量蛋白质组学 基于标记的定量蛋白质组学是利用相对原子质量大的稳定同位素来标记样品中的肽。标记肽与仅含有天然同位素的肽段之间可预测的质量差异使得区分并相对定量 2 种肽成为可能^[16]。目前常用的标记定量蛋白质组学技术有 iTRAQ、细胞培养稳定同位素标记技术(stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)、同位素标记亲和标签(isotope-coded affinity tags, ICAT)等。iTRAQ 技术利用多种同位素试剂标记多肽氨基末端或赖氨酸侧链基团,可同时比较多达 8 种样品之间的蛋白表达量,是近年来定量蛋白质组学常用的高通量筛选技术^[17]。蛋白质酶解成多肽后用 iTRAQ 试剂进行标记,随后进行 LC-MS/MS 分析。在二级质谱过程中,iTRAQ 试剂裂解成低相对分子质量的报告基团,报告基团离子强度间的差异代表其所标记多肽的相对丰度^[18]。近年来,iTRAQ 在玻璃体蛋白质组学研究中应用广泛,实现了诸多蛋白的定量分析,并鉴定出多种差异蛋白^[19-20]。SILAC 属于体内标记技术,可用于视网膜色素上皮细胞或 Müller 细胞的蛋白质组学研究^[21],但不适用于玻璃体蛋白质组学分析。基于 ICAT 的玻璃体蛋白质组学研究目前尚未见报道。

1.2.4 靶向蛋白质组学 靶向蛋白质组学(multiple reaction monitoring, MRM)基于已知或假定信息有针对性地对符合规则的离子进行信号采集,同时去除大量不符合规则离子信号的干

扰,属于目标蛋白质组学研究,常用于 iTRAQ 后续差异蛋白的验证,具有高灵敏度、高准确度等优势^[22]。

2 玻璃体视网膜疾病中的玻璃体蛋白质组学应用

2.1 糖尿病视网膜病变

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是长期暴露于高血糖环境引起的进展性视网膜微血管病变,是欧美国家中年人致盲的首要原因。针对来自玻璃体手术的 PDR 患者玻璃体蛋白质组学研究开展较早,一些生物标志物的发现和验证为早期诊断、适时干预和发现新的治疗靶点提供了可能。Yamane 等^[23]在 2003 年应用 2D-PAGE 技术比较了 33 例 PDR 患者与 26 例黄斑裂孔患者的玻璃体蛋白组成,提供了最初的 PDR 玻璃体蛋白质组学数据。随后, Kim 等^[11]用相同的方法鉴定出一些 PDR 相关的差异蛋白,如胰岛素样生长因子、色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)、载脂蛋白、丝氨酸蛋白酶抑制剂、补体成分以及一些被认为与促进血管生成、血管通透性相关的蛋白,如碳酸酐酶、骨桥蛋白、血管紧张素原和丛生蛋白。Garcia-Ramirez 等^[24]发现 PDR 患者中有 8 种蛋白表达升高,而 PEDF、光感受器间视黄醇结合蛋白和人间 α -胰蛋白酶抑制剂重链 H2 蛋白表达降低,其中光感受器间视黄醇结合蛋白在 DR 早期即出现表达下调,可能与视网膜神经退行性变相关。基于 LC 技术进行肽的分离能够鉴定出更多的蛋白。Kim 等^[10]应用 nanoLC-MALDI-MS/MS 和 nanoLC-ESI-MS/MS 鉴定出 531 种蛋白,而 SDS-PAGE 联合 nanoLC-MS/MS 则鉴定出 252 种蛋白^[25]。Wang 等^[26]采用 2D-DIGE 在 PDR 患者和正常对照中鉴定出 29 种差异表达蛋白。在随后的研究中,该研究团队应用 LC-ESI-MS/MS 联合 Label-free 定量的方法在 8 例 PDR 患者与正常人玻璃体内鉴定出 96 种差异表达的蛋白,包括载脂蛋白 A-1、微管蛋白、雌激素受体 α 、血管生成素相关蛋白-6 等,主要涉及糖酵解/糖异生、补体与凝血、缝隙连接和吞噬等生化途径^[8]。

部分研究聚焦于 PDR 治疗前后的玻璃体蛋白差异。Loukovaara 等^[14]应用 Label-free 定量蛋白质组学 59 例非 PDR 患者与 79 例 PDR 患者的玻璃体中定量鉴定出 230 种蛋白明显上调,并筛选出 4 种潜在的 PDR 生物标志物;PDR 组中接受抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)治疗的患者玻璃体内共发现 72 种蛋白表达较未接受抗 VEGF 治疗患者下调,涉及细胞黏附、载脂蛋白、细胞凋亡、免疫反应等诸多生物进程,其中 19 种原本在 PDR 组中上调的蛋白在接受抗 VEGF 治疗 PDR 患者中表达下调。类似地,报道报道包括载脂蛋白 A2 和铜蓝蛋白在内的 218 种蛋白在 PDR 抗 VEGF 治疗组中表达明显下降^[27]。

诸多候选生物标志物的发现为深入了解 DR 的病理生理机制提供了帮助,但这些生物标志物的临床验证始终是一个难题。一些蛋白的特异性单克隆抗体难以获取,使得基于 ELISA 或 Western blot 方法的蛋白验证困难重重。MRM 技术为解决这一问题提供了新的方法。Jin 等^[28]通过数据挖掘筛选出 96 种 DR 候选生物标志物,并进一步采用 MRM 在患者血浆中进

行验证,最终确证了载脂蛋白 4、补体 C7、丛生蛋白、人间 α -胰蛋白酶抑制剂重链 H2 是早期诊断 DR 的有效标志物。同样地,经 MRM 建立起的诊断非 PDR 多重标志物比单一标志物特异度更高^[29]。

与 PDR 相比,针对糖尿病性黄斑水肿(diabetic macular edema, DME)的玻璃体蛋白质组学的研究则较少。这些研究中最重要发现之一是揭示了细胞外碳酸酐酶-I 和激肽释放酶介导的固有免疫在 DME 发病机制中的作用^[30]。Kita 等^[31]研究发现,血浆激肽释放酶原和激肽释放酶在 DME 患者玻璃体中较对照组分别升高了 2 倍和 11 倍,证实血浆激肽释放酶-激肽系统是独立于 VEGF 的 DME 介导因素。此外, Hernández 等^[32]在 DME 患者与非 DME 的 PDR 患者及黄斑裂孔对照患者玻璃体中鉴定出血红素结合蛋白、丛生蛋白、甲状腺素结合蛋白和 β -晶状体蛋白 S 4 种差异表达的蛋白质,其中,血红素结合蛋白的显著升高可造成视网膜色素上皮细胞的破坏,血管通透性增加,这表明其可能与 DME 的发病有关。

2.2 黄斑前膜

黄斑前膜(epiretinal membranes, ERM)以视网膜前玻璃体界面纤维细胞组织的增生为特征,可造成明显的视物变形和视力下降。ERM 被认为与玻璃体后脱离相关,是玻璃体后脱离诱发的内界膜中断使得其下的神经胶质细胞等迁移并增生的结果^[20]。Pollreis 等^[18]利用 iTRAQ 比较了 8 例 ERM 患者玻璃体和房水中的蛋白组成,共鉴定出 323 种差异蛋白,多涉及补体激活、蛋白水解和细胞黏附等生化途径,其中 PDGF-AA 在玻璃体中的含量高于房水。Yu 等^[15]通过 Label-free 定量蛋白质组学分析了 ERM 与尸眼对照的玻璃体蛋白质,共发现 226 种差异蛋白,揭示了 ERM 发病过程中涉及炎症、免疫反应和细胞骨架重塑等多种病理过程,并提出 ERM 的可能标志物为泛素结合酶 E2O 和补体 C4a。

2.3 孔源性视网膜脱离和 PVR

孔源性视网膜脱离(rhegmatogenous retinal detachment, RRD)以视网膜裂孔形成后视网膜神经上皮层与色素上皮层之间视网膜下液积聚为特征,其发病机制复杂,涉及玻璃体视网膜界面结构和分子改变等,可造成严重的视力损害。Mandal 等^[33]分析了兔 RRD 模型的玻璃体蛋白质组成,为了解 RRD 形成后玻璃体内蛋白改变奠定了基础。

PVR 是视网膜色素上皮细胞、神经胶质细胞、炎性细胞在视网膜表面、视网膜下和玻璃体内增生形成的纤维膜,是视网膜异常的创伤愈合进程。PVR 是 RRD 术后的重要并发症,是造成 RRD 手术失败的重要原因之一。Yu 等^[34]通过分析 24 例 RRD 伴 PVR 患者的玻璃体蛋白发现, p53 和转录因子 E2F1 可能是该进程中的新靶点。定量 2D-PAGE 研究观察到 PEDF、凝血素、甲状腺素结合蛋白和组织蛋白酶 D 特异性高表达于 RRD 和 PVR^[35]。基于 nanoLC-MS/MS 的研究分析了中度 PVR(B 级)、严重 PVR(C 级和 D 级)和对照组间的玻璃体蛋白差异,结果显示 PVR 患者玻璃体中补体、丝氨酸蛋白酶抑制剂、转录和翻译调节相关蛋白表达上调,细胞骨架蛋白和代谢酶表达显著下调,推测 PVR 是与代谢紊乱、免疫反应和细胞骨架重

塑相关的复杂病理过程,并提出激肽原 1 是 PVR 的候选生物标志物^[36]。此外, Kuo 等^[37]研究发现, 锌指蛋白 670 (zinc finger protein 670, ZFP670) 和前列腺素 D2 合成酶 (prostaglandin D2 synthase, PGD2S) 在 PVR 患者玻璃体中表达显著升高。

进一步, Wu 等^[19]通过 iTRAQ 定量分析了 RRD 伴脉络膜脱离与 RRD 之间的玻璃体蛋白差异, 定量鉴定出 103 种差异蛋白, 提示补体、炎症和凝血级联反应在 RRD 伴脉络膜脱离病理机制中具有重要作用。

2.4 湿性年龄相关性黄斑变性

湿性年龄相关性黄斑变性 (wet age-related macular degeneration, wAMD) 以脉络膜新生血管为特征, 是 60 岁以上老年人致盲的主要原因。由于玻璃体切割术并非 wAMD 治疗的主要手段, 因而患者玻璃体样本常常难以获得。此前针对 AMD 的蛋白质组学研究常以房水为样本^[22], 但获取患者玻璃体样本并分析其蛋白质组仍是加深对 wAMD 病理生理机制认识的有效途径。Koss 等^[38]通过毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE)-MS 联合 LC-MS/MS, 在 73 例未治疗 wAMD 患者玻璃体中观察到 19 种非 AMD 特异性蛋白质较正常对照升高, 如 α -1-抗胰蛋白酶、纤维蛋白原 α 链和前列腺素 H2-D 异构酶等, 提示蛋白酶、免疫反应、补体途径在 wAMD 病程中被激活。Nobl 等^[39]用同样的方法鉴定并证实了 4 种可能参与 wAMD 病理生理改变的蛋白, 即丛生蛋白、旋光蛋白、PEDF 和前列腺素 H2-D 异构酶。

2.5 视网膜静脉阻塞

视网膜静脉阻塞 (retinal vein occlusion, RVO) 常伴随黄斑水肿, 是常见的造成视力损害的疾病之一, 但目前针对 RVO 的蛋白质组学研究仍少见报道。Yao 等^[40]首次将蛋白质组学应用于 RVO 的研究。Reich 等^[41]通过 CE-MS 联合 LC-MS/MS 比较未治疗 RVO 患者与黄斑裂孔患者之间的玻璃体蛋白组差异, 发现并验证了 5 种候选标志物蛋白, 即丛生蛋白、补体 C3、Ig lambda 样多肽 5 (Ig lambda-like polypeptide 5, IGLI5)、旋光蛋白和玻连蛋白。Dacheva 等^[42]分析了 15 例未经治疗的视网膜分支静脉阻塞 (branch retinal vein occlusion, BRVO) 患者的玻璃体蛋白组成, 发现与黄斑裂孔患者相比, BRVO 患者玻璃体中丛生蛋白、补体 C3、前列腺素 H2-D 异构酶和玻连蛋白含量明显升高, 视神经纤维素含量则明显降低。

3 问题与展望

玻璃体蛋白质组学是研究玻璃体视网膜疾病的病理生理机制、治疗靶点和生物标志物的有效方法, 但由于玻璃体样本的获取依赖于有创的方法, 因而在一些非首选手术治疗的玻璃体视网膜疾病的应用方面受到一定限制。许多玻璃体视网膜疾病, 如病理性近视等仍缺乏相应的玻璃体蛋白质组资料。因而对这些疾病的玻璃体蛋白质组学进行研究是未来的方向之一。

此外, 目前玻璃体蛋白质组学研究中发现的候选生物标志物尚依赖于进一步临床研究的证实, 多种差异蛋白的作用机制及其在临床诊断、评估中的应用仍有待深入研究。

定量蛋白质组学技术的发展为研究蛋白组成相对复杂的

样本提供了新的平台。然而, 目前玻璃体蛋白质组学研究的技术仍有一定的局限性, 如 DDA (data dependent acquisition) 数据采集模式下存在不同批次样本质谱数据可比较性低的问题。DIA (data independent acquisition) 数据采集模式的建立、绝对定量技术等新平台的发展, 将为玻璃体蛋白质组学研究结果提供更可靠的支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Grus FH, Joachim SC, Pfeiffer N. Proteomics in ocular fluids [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2007, 1 (8): 876-888. DOI: 10.1002/prca.200700105.
- [2] Angi M, Kalirai H, Coupland SE, et al. Proteomic analyses of the vitreous humour [J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 148039 [2019-01-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22973072>. DOI: 10.1155/2012/148039.
- [3] Rocha AS, Santos FM, Monteiro JP, et al. Trends in proteomic analysis of human vitreous humor samples [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35 (17): 2495-2508. DOI: 10.1002/elps.201400049.
- [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] Bouhenni RA, Al Shahwan S, Morales J, et al. Identification of differentially expressed proteins in the aqueous humor of primary congenital glaucoma [J]. *Exp Eye Res*, 2011, 92 (1): 67-75. DOI: 10.1016/j.exer.2010.11.004.
- [6] Zhou HY, Yan H, Wang LL, et al. Quantitative proteomics analysis by iTRAQ in human nuclear cataracts of different ages and normal lens nuclei [J]. *Proteomics Clin Appl*, 2015, 9 (7-8): 776-786. DOI: 10.1002/prca.201400061.
- [7] Jay NL, Gillies M. Proteomic analysis of ophthalmic disease [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 40 (7): 755-763. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2012.02788.x.
- [8] Wang H, Feng L, Hu J, et al. Differentiating vitreous proteomes in proliferative diabetic retinopathy using high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 108: 110-119. DOI: 10.1016/j.exer.2012.11.023.
- [9] García-Ramírez M, Canals F, Hernández C, et al. Proteomic analysis of human vitreous fluid by fluorescence-based difference gel electrophoresis (DIGE): a new strategy for identifying potential candidates in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy [J]. *Diabetologia*, 2007, 50 (6): 1294-1303. DOI: 10.1007/s00125-007-0627-y.
- [10] Kim T, Kim SJ, Kim K, et al. Profiling of vitreous proteomes from proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic patients [J]. *Proteomics*, 2007, 7 (22): 4203-4215. DOI: 10.1002/pmic.200700745.
- [11] Kim SJ, Kim S, Park J, et al. Differential expression of vitreous proteins in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Curr Eye Res*, 2006, 31 (3): 231-240. DOI: 10.1080/02713680600557030.
- [12] Mandal N, Heegaard S, Prause JU, et al. Ocular proteomics with emphasis on two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry [J]. *Biol Proced Online*, 2009, 12 (1): 56-88. DOI: 10.1007/s12575-009-9019-7.
- [13] Cehofski LJ, Mandal N, Honoré B, et al. Analytical platforms in vitreoretinal proteomics [J]. *Bioanalysis*, 2014, 6 (22): 3051-3066. DOI: 10.4155/bio.14.227.
- [14] Loukovaara S, Nurkkala H, Tamene F, et al. Quantitative proteomics analysis of vitreous humor from diabetic retinopathy patients [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14 (12): 5131-5143. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00900.
- [15] Yu J, Feng L, Wu Y, et al. Vitreous proteomic analysis of idiopathic epiretinal membranes [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10 (10): 2558-2566. DOI: 10.1039/c4mb00240g.
- [16] Filiou MD, Martins-de-Souza D, Guest PC, et al. To label or not to label: applications of quantitative proteomics in neuroscience research [J]. *Proteomics*, 2012, 12 (4-5): 736-747. DOI: 10.1002/pmic.

- 201100350.
- [17] Evans C, Noirel J, Ow SY, et al. An insight into iTRAQ: where do we stand now? [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 404 (4) : 1011–1027. DOI:10.1007/s00216-012-5918-6.
- [18] Pollreisz A, Funk M, Breitwieser FP, et al. Quantitative proteomics of aqueous and vitreous fluid from patients with idiopathic epiretinal membranes [J]. Exp Eye Res, 2013, 108 : 48–58. DOI:10.1016/j.exer.2012.11.010.
- [19] Wu Z, Ding N, Yu M, et al. Identification of potential biomarkers for rhegmatogenous retinal detachment associated with choroidal detachment by vitreous iTRAQ-based proteomic profiling [J/OL]. Int J Mol Sci, 2016, 17 (12) : E2052 [2019-01-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27941623>. DOI:10.3390/ijms17122052.
- [20] Mandal N, Kofod M, Vorum H, et al. Proteomic analysis of human vitreous associated with idiopathic epiretinal membrane [J]. Acta Ophthalmol, 2013, 91 (4) : 333–334. DOI:10.1111/aos.12075.
- [21] Merl J, Ueffing M, Hauck SM, et al. Direct comparison of MS-based label-free and SILAC quantitative proteome profiling strategies in primary retinal Müller cells [J]. Proteomics, 2012, 12 (12) : 1902–1911. DOI:10.1002/pmic.201100549.
- [22] Kim TW, Kang JW, Ahn J, et al. Proteomic analysis of the aqueous humor in age-related macular degeneration (AMD) patients [J]. J Proteome Res, 2012, 11 (8) : 4034–4043. DOI:10.1021/pr300080s.
- [23] Yamane K, Minamoto A, Yamashita H, et al. Proteome analysis of human vitreous proteins [J]. Mol Cell Proteomics, 2003, 2 (11) : 1177–1187. DOI:10.1074/mcp.M300038-MCP200.
- [24] Garcia-Ramirez M, Hernández C, Villarreal M, et al. Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) is downregulated at early stages of diabetic retinopathy [J]. Diabetologia, 2009, 52 (12) : 2633–2641. DOI:10.1007/s00125-009-1548-8.
- [25] Gao BB, Chen X, Timothy N, et al. Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy [J]. J Proteome Res, 2008, 7 (6) : 2516–2525. DOI:10.1021/pr800112g.
- [26] Wang H, Feng L, Hu JW, et al. Characterisation of the vitreous proteome in proliferative diabetic retinopathy [J/OL]. Proteome Sci, 2012, 10 (1) : 15 [2019-01-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22390717>. DOI:10.1186/1477-5956-10-15.
- [27] Zou C, Zhao M, Yu J, et al. Difference in the vitreal protein profiles of patients with proliferative diabetic retinopathy with and without intravitreal conbercept injection [J/OL]. J Ophthalmol, 2018, 2018 : 7397610 [2019-01-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29850212>. DOI:10.1155/2018/7397610.
- [28] Jin J, Min H, Kim SJ, et al. Development of diagnostic biomarkers for detecting diabetic retinopathy at early stages using quantitative proteomics [J/OL]. J Diabetes Res, 2016, 2016 : 6571976 [2019-01-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26665153>. DOI:10.1155/2016/6571976.
- [29] Kim K, Kim SJ, Han D, et al. Verification of multimarkers for detection of early stage diabetic retinopathy using multiple reaction monitoring [J]. J Proteome Res, 2013, 12 (3) : 1078–1089. DOI:10.1021/pr3012073.
- [30] Gao BB, Clermont A, Rook S, et al. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation [J]. Nat Med, 2007, 13 (2) : 181–188. DOI:10.1038/nm1534.
- [31] Kita T, Clermont AC, Murugesan N, et al. Plasma Kallikrein-Kinin system as a VEGF-independent mediator of diabetic macular edema [J]. Diabetes, 2015, 64 (10) : 3588–3599. DOI:10.2337/db15-0317.
- [32] Hernández C, García-Ramírez M, Colomé N, et al. Identification of new pathogenic candidates for diabetic macular edema using fluorescence-based difference gel electrophoresis analysis [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2013, 29 (6) : 499–506. DOI:10.1002/dmrr.2419.
- [33] Mandal N, Lewis GP, Fisher SK, et al. Proteomic analysis of the vitreous following experimental retinal detachment in rabbits [J/OL]. J Ophthalmol, 2015, 2015 : 583040 [2019-01-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26664739>. DOI:10.1155/2015/583040.
- [34] Yu J, Peng R, Chen H, et al. Elucidation of the pathogenic mechanism of rhegmatogenous retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy by proteomic analysis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53 (13) : 8146–8153. DOI:10.1167/iovs.12-10079.
- [35] Shitama T, Hayashi H, Noge S, et al. Proteome profiling of vitreoretinal diseases by cluster analysis [J]. Proteomics Clin Appl, 2008, 2 (9) : 1265–1280. DOI:10.1002/prca.200800017.
- [36] Yu J, Liu F, Cui SJ, et al. Vitreous proteomic analysis of proliferative vitreoretinopathy [J]. Proteomics, 2008, 8 (17) : 3667–3678. DOI:10.1002/pmic.200700824.
- [37] Kuo HK, Chen YH, Huang F, et al. The upregulation of zinc finger protein 670 and prostaglandin D2 synthase in proliferative vitreoretinopathy [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2016, 254 (2) : 205–213. DOI:10.1007/s00417-015-3022-2.
- [38] Koss MJ, Hoffmann J, Nguyen N, et al. Proteomics of vitreous humor of patients with exudative age-related macular degeneration [J/OL]. PLoS One, 2014, 9 (5) : e96895 [2019-01-03]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24828575>. DOI:10.1371/journal.pone.0096895.
- [39] Nobl M, Reich M, Dacheva I, et al. Proteomics of vitreous in neovascular age-related macular degeneration [J]. Exp Eye Res, 2016, 146 : 107–117. DOI:10.1016/j.exer.2016.01.001.
- [40] Yao J, Chen Z, Yang Q, et al. Proteomic analysis of aqueous humor from patients with branch retinal vein occlusion-induced macular edema [J]. Int J Mol Med, 2013, 32 (6) : 1421–1434. DOI:10.3892/ijmm.2013.1509.
- [41] Reich M, Dacheva I, Nobl M, et al. Proteomic analysis of vitreous humor in retinal vein occlusion [J/OL]. PLoS One, 2016, 11 (6) : e0158001 [2019-01-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27362861>. DOI:10.1371/journal.pone.0158001.
- [42] Dacheva I, Reich M, Nobl M, et al. Proteome analysis of undiluted vitreous humor in patients with branch retinal vein occlusion [J]. Ophthalmologie, 2018, 115 (3) : 203–215. DOI:10.1007/s00347-017-0469-z.

(收稿日期:2019-01-12 修回日期:2019-08-01)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引3~5个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组,中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的MeSH数据库中选取关键词,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用,但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称,各关键词之间用“;”分隔。

(本刊编辑部)