

· 专家述评 ·

# 关注和了解人泪液蛋白质组学的研究及其临床意义

Zhou Lei 刘丹宁

**【摘要】** 泪液是眼表的一种成分复杂的体液,可能含有数千种蛋白质及其他分子,研究已证实这些成分的改变在眼病的发生和发展中具有重要作用。泪液标本相对容易获取,可用于眼表疾病及其他眼科疾病或系统性疾病的研究,也可用于生物标志物的鉴定,因此是临床诊疗和新药研发的重要依据。跟踪和了解泪液蛋白质组学的研究技术和泪液蛋白质组学的研究进展有助于相关研究的深入开展,眼科医师应密切关注眼表疾病泪液蛋白质组分的变化及其临床意义,关注泪液蛋白质组学未来的发展方向,以指导相关眼病的诊疗和研究。

**【关键词】** 眼蛋白/分析; 蛋白质组学/方法; 泪液/化学成分; 人

**Proteomics of human tears: towards clinical applications** 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; Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

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

**【Abstract】** Tear fluid is a complex body fluid, which may contain thousands of protein/peptides and other molecules. Studies have determined that the changes in the chemical compositions of tears play an important role in some diseases and their progression. Tear fluid is a useful and easily accessible source for understanding ocular surface diseases, other eye diseases, and systemic diseases. It can also be used for identification of biomarkers for clinical applications and pharmaceutical development. Therefore, quantitative proteomic analysis of tears may provide very important information for diagnosis and treatment of eye diseases or the development of new drugs. Knowledge of the current proteomic technologies for tear analysis is helpful for conducting studies. In addition, ophthalmologists should pay close attentions to the association between tear proteomic changes and eye diseases, recent advances in tear proteomics and their applications in studying ocular surface diseases and conditions.

**【Key words】** Eye proteins/analysis; Proteome/methods; Tears/chemistry; Humans

泪液是眼球表面具有流动性的液体,在眼表形成泪膜,与角膜上皮、结膜上皮共同构成眼表结构。泪液中富含多种蛋白质成分,近年来关于泪液蛋白质组学的研究逐渐深入,在眼表疾病的诊断、治疗等方面具有重要的临床意义。因此,眼科医师应该充分了解泪液中蛋白质成分变化与眼表疾病的关系,掌握泪液中蛋白质检测的具体方法和临床意义。

## 1 泪膜的产生、组成和基本功能

泪液通过瞬目均匀覆盖在结膜上皮、角膜上皮表面,形成 7~10  $\mu\text{m}$  厚的泪膜,是维持眼表上皮正常结构及功能的基础。泪膜润滑眼球表面并保证光线投射到视网膜,泪膜的流动性及泪液蛋白的抑菌作用可避免眼表微生物的滋生,泪膜的脂质层则减少泪液的蒸发,稳定并保持泪膜的弧度。泪液中含丰富的营养成分,为角膜组织提供营养<sup>[1]</sup>。在正常情况下,泪液含量为 5~10  $\mu\text{l}$ ,分泌率为 1.2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ,更新率为 16%/min,正常流泪及反射性流泪的泪液(源于角膜神经受刺激)由主泪腺分泌,而基础泪液则主要由副泪腺分泌。泪液总量虽少,但却含有丰富的蛋白质、多肽、电解质、

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.001

作者单位: 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 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

脂质及小分子代谢物,这些成分主要来源于主泪腺、副泪腺、眼表上皮细胞、杯状细胞、睑板腺及血液中的渗出液等。泪膜从外向内由脂质层、水样层和黏蛋白层构成,表面的脂质层主要由睑板腺分泌,最近研究发现脂质层可进一步分为外层非极性脂质层及含有嵌入蛋白的内层极性脂质层<sup>[2]</sup>。泪液表面的脂质层能够阻止水样层泪液蒸发过快,保证泪膜的稳定,同时也是防止微生物滋生的屏障;泪液中间的水样层主要由主泪腺及副泪腺分泌,含有丰富的钠、钾、钙、镁、氯、磷、碳酸氢盐等电解质以及酶、生长因子、细胞因子等蛋白/多肽和氨基酸、尿素、乳酸盐等小分子代谢物;而泪液内层的黏蛋白层紧贴眼表细胞,主要由眼表上皮细胞和结膜杯状细胞分泌,泪腺也分泌少量黏蛋白成分。黏蛋白是带有 O 链碳水化合物及 1 个蛋白核心构成的大分子糖蛋白。

## 2 泪液蛋白质组学的最新进展

### 2.1 泪液蛋白质组学分析技术

**2.1.1 泪液的采集与保存** 泪液的采集是进行蛋白质组学分析的前提,采集到的泪液的质或量直接影响着泪液蛋白质的分析结果。目前常用的 2 种泪液采集方法是 Schirmer 试纸法及玻璃毛细管负压法。Schirmer 法是在非表面麻醉下将试纸置于结膜囊内 5 min,观察试纸被泪液浸湿的长度,是临床检测基础泪液分泌量的标准方法,这种方法所采集的泪液可作为泪液蛋白质组学研究的标本。毛细管法则是应用一个末端拉细的玻璃毛细管直接在下睑结膜囊中吸取泪液。Green-Church 等<sup>[3]</sup>发现 Schirmer 试纸法采集的泪液中血液清蛋白含量多于玻璃毛细管法。 $\alpha$ -烯醇化酶、S100 钙结合蛋白等蛋白质仅存在于 Schirmer 试纸法采集的泪液中,而在玻璃毛细管法采集的泪液中则阙如。此外,Schirmer 试纸法所采集的泪液中还包含眼表(结膜、角膜)上皮细胞。理论上,玻璃毛细管法可直接吸取结膜囊的泪液,应该是更准确的泪液采集方法,实际上采集泪液时毛细管容易碰触角膜,或因长时间采集而导致反射性泪液分泌,且玻璃毛细管法很难采集到中重度干眼患者的泪液,而 Schirmer 试纸法能够成功地采集干眼患者的泪液,仅需 1 mm 长的泪液湿润量就能够达到泪液蛋白质组学研究所需的样本量。

泪液含有多种酶类,泪液标本的合理存放是保证泪液蛋白质组学研究结果更为精确的另一个重要因素。研究显示,室温下保存 4~8 h 泪液蛋白总量会明显下降,室温保存 16 h 后泪液蛋白含量下降至

70%~80%。在 4℃ 条件下泪液标本可保存 1 周,在 -20℃ 条件下可保存 2 个月以上,-70℃ 以下的泪液标本可保存 4 个月以上<sup>[4]</sup>。

### 2.1.2 泪液蛋白质组学分析技术的研究背景及发展

近 20 年泪液蛋白质组学分析技术得到了飞速发展。90 年代以前人们应用 2D 凝胶电泳联合抗体<sup>[5]</sup>、高效液相色谱分析(high performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[6]</sup>等传统方法仅鉴定出十余种泪液蛋白。随着泪液蛋白质组学分析技术的发展,质谱分析法(mass spectrometry, MS)成为研究蛋白质组学的最重要分析方法。目前,纳升 HPLC 联合高分辨质谱仪可从泪液样本中一次性鉴定并定量上千种泪液蛋白。

SELDI/MALDI-TOF-MS 也曾用于泪液蛋白质组学的研究,SELDI-TOF 技术对分析相对分子质量在 1 500~30 000 的多肽和蛋白质比较有利。MALDI-TOF 技术也被用于鉴定人泪液中低相对分子质量(700~4 000)的多肽<sup>[7]</sup>。应用 SELDI-TOF 技术可在泪液标本中检出溶菌酶(相对分子质量为 14 600)和脂质转运蛋白(相对分子质量为 17 300),也可检测到鼻咽癌相关富含脯氨酸蛋白(相对分子质量为 4 000)、富含脯氨酸蛋白 4(相对分子质量为 4 000)、 $\alpha_1$ -胰蛋白酶抑制剂(相对分子质量为 4 100)和富含脯氨酸蛋白 3(相对分子质量为 5 800)等小相对分子质量蛋白和肽类<sup>[8]</sup>。Zhou 等<sup>[9]</sup>应用 SELDI-TOF 技术对病理情况下的泪液进行检测,在眼表外伤患者泪液中发现了 a-defensin 1、a-defensin 2 和 a-defensin 3(相对分子质量分别为 3 442、3 371 和 3 486),且在翼状胬肉患者泪液中发现了 S100 A8(相对分子质量为 10 800)和 S100 A9(相对分子质量为 12 700)。SELDI/MALDI-TOF 技术是一种快速、简单的泪液蛋白检测方法,但仅能鉴定蛋白/肽类的相对分子质量,后续的鉴定步骤则繁琐而缓慢。

高效液相色谱质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS)是 HPLC 与串联质谱法相结合的蛋白质组学研究方法。LC 能有效分离待测样品中的有机物成分,而串联质谱能够对分离的有机物进行逐个分析,得到有机物的相对分子质量、结构(在某些情况下)和浓度(定量分析)等信息。大量的泪液蛋白通过 LC-MS/MS 相继被鉴定出来。早期 Zhou 等<sup>[10]</sup>应用 RP-HPLC 和 nanoLC-MS/MS 发现了 60 种泪液蛋白,de Souza 等<sup>[11]</sup>应用 1D SDS-PAGE 和 LTQ-FT/LTQ-Orbitrap 质谱仪检测出 491 种泪液蛋白。可见,蛋白预分离方法结合 MS 是对泪液蛋白进行大批量鉴定的重要技术方法。

质谱多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 技术是一种基于已知信息或假定信息有针对性地获取数据进行质谱信号采集的技术。作为药物分子定量的常规质谱技术,MRM 也是目前公认的对多肽和蛋白进行绝对定量的首选方法。MRM 技术具有灵敏度高、重现性好、多通道和高通量的优势,与传统的基于抗体的 ELISA 和 Western blot 检测技术相比,MRM 不需抗体,也成为生物标志物验证阶段的首选方法。MRM 应用的难点在于方法学的研发,运用高分辨 MRM (high resolution MRM, HR-MRM) 技术, Tong 等<sup>[12]</sup> 仅用约 1  $\mu\text{l}$  的泪液即可同时定量检测近 50 种的泪液蛋白。

研究的发展需要更加高效的蛋白质组学研究方法对成百上千的蛋白进行定量分析。同位素标记相对和绝对定量 (isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 技术是一种体外同重同位素标记,利用多种同位素试剂标记蛋白多肽 N 末端或赖氨酸侧链基团,经高精度质谱仪串联分析同时比较多达 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。应用 iTRAQ 技术可同时对病理状态下(如干眼、青光眼)的泪液蛋白和正常对照泪液蛋白进行检测,鉴定患者泪液中的蛋白标志物<sup>[13]</sup>,也可用于治疗前后泪液蛋白表达量的动态分析<sup>[14]</sup>。

近年来抗体相关蛋白检测方法也得到发展,如基于质谱多反应监测技术 (MRM-MS) 和同位素标记标准肽段的蛋白质定量技术。稳定同位素和多肽抗体捕获 (stable isotope standards and capture by anti-peptide antibodies, SISCAPA) 技术可应用免疫亲和富集和稀释同位素,并联合 MRM-MS 技术,以达到对候选标志物进行定量的目的<sup>[15]</sup>。流式微球分析技术 (cytometric bead-based assay, CBA) 是建立在免疫微球、ELISA 和流式细胞分析等技术基础上的一种新的血清学实验方法,其主要机制是将不同的单克隆抗体结合到微球的不同位点表面,已应用于人类泪液的多重细胞因子检测<sup>[16]</sup>。抗体蛋白芯片具有微型化、集成化、高通量化的特点,可检测某一特定的生理或病理过程中相关蛋白的表达丰度<sup>[17]</sup>。这些抗体相关蛋白检测系统具有超敏感和同时检测多种蛋白的特点,但其局限性在于必须通过目标抗体进行目标蛋白的检测。由于已知抗体数量的局限性,因此抗体相关蛋白检测方法无法像 MS 那样非靶向性地检测出样本中大量的蛋白。

## 2.2 正常人泪液中的蛋白质组分研究

通过不同的蛋白质组学研究方法,许多研究发现并

丰富了人类泪液蛋白质组。早期的研究已鉴定出人类泪液蛋白质组至少包含 500 种蛋白质, de Souza 等<sup>[11]</sup> 应用 LC/MS-LTQ-FT 和 LC/MS-LTQ-Orbitrap 综合方法鉴定出 491 种泪液蛋白。Zhou 等<sup>[18]</sup> 应用先进的高效 Triple-TOF 5600 system (AB SCIEX) 鉴定出至少 1 500 种泪液蛋白。

根据目前的泪液蛋白质研究结果可将泪液蛋白分为 4 类<sup>[19]</sup>: (1) 来自眼表主泪腺、睑板腺、杯状细胞、副泪腺分泌的蛋白,这类蛋白是泪液蛋白的主要组成部分,包括溶菌酶、乳铁蛋白、sIgA、脂质转氨酶-1 (也称泪液特异性前白蛋白, tear-specific prealbumin, LCN-1)、前列腺蛋白类脂肪酶、lacrutin 蛋白和富含脯氨酸蛋白质等。(2) 眼表细胞/组织释放蛋白 这类蛋白参与眼表功能的维护,是眼表细胞正常分泌或细胞死亡后分泌到泪液中的蛋白。(3) 异常分泌的蛋白 这类蛋白来自于病理状态下组织分泌的蛋白,因此可作为疾病的诊断标志物。(4) 外来蛋白 这类蛋白并非眼部自身组织分泌,而是来自于外来生物,如传染性微生物分泌并释放到泪液中的代谢产物。根据泪液中蛋白含量不同,可将泪液蛋白分为 3 类,高含量的泪液蛋白、来自眼表组织或细胞或细胞代谢信号通路产生的中等含量蛋白或分子和低含量的细胞因子及生长因子等。泪液中这些丰富的蛋白质组并不是血浆蛋白质组的简单反映,其成分和质量浓度均存在明显差异,主要体现在泪液中的一些蛋白承担着防御病原微生物的功能。泪液也是眼部免疫系统的重要组成部分,如溶菌酶和乳铁蛋白均具有抗微生物活性。

## 3 泪液蛋白质组学的研究方向

随着蛋白质组学及质谱技术的飞速发展,泪液蛋白质组学研究更加深入,泪液蛋白质检测有望成为研究眼部系统性疾病的发病机制、疾病筛查、诊断和治疗效果评估的重要工具。未来泪液蛋白质组学研究将着眼于以下方面: (1) 规范泪液标本的采集、储存、提取和样本制备,以确保研究条件的标准化和结果的可信度。(2) 应用先进的 MRM 技术进行定量蛋白质组学研究。MRM 可对靶蛋白进行精确定量分析,并可同时定量几十种到上百种蛋白质,特别适用于标本量有限的泪液分析,这种分析技术有高效、敏感、精确和多通道检测的优势,为泪液蛋白质组学研究进入临床疾病诊断、治疗提供了可操作性。(3) 开展泪液蛋白质组学/代谢组学的人口普查研究来建立人类泪液蛋白质组/代谢产物的正常值标准,使得泪液检测能够像血液、尿液检测一样应用于临床检验。(4) 开展全身疾

病的泪液蛋白质组学/代谢组学研究,使得泪液研究不仅局限于眼部疾病。研究证实泪液作为体液的一部分,可同尿液、血液一样反映乳腺癌、肺癌、糖尿病等全身疾病的发生和发展<sup>[20]</sup>。(5)开展泪液蛋白的功能研究,明确泪液中蛋白的功能对泪液的稳定、眼表的保护和疾病的机制研究、治疗提供依据。

最近的研究已充分证明,很多眼表及眼科疾病都会发生泪液蛋白质组分的改变,一些泪液蛋白质已经成为多种眼科疾病的标志物,在眼病的诊断和治疗监测过程中发挥指导作用。眼科研究人员和临床眼科医师应紧密跟踪并关注泪液蛋白质组学研究方法和研究结果的最新进展,将这些技术更好地应用于眼科临床,充分利用这些研究资源服务于临床工作,提供更多地相关的临床研究资料,以丰富泪液蛋白质组学研究的理论体系。

## 参考文献

- [1] 赵堪兴,杨培增. 眼科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2012: 74-75.
- [2] Green-Church KB, Butovich I, Willcox M, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction; report of the subcommittee on tear film lipids and lipideprotein interactions in health and disease[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(4): 1979-1993. doi: 10. 1167/ iovs. 10-6997d.
- [3] Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM, et al. Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches[J]. Mol Vis, 2008, 14: 456-470.
- [4] Sitaramamma T, Shivaji S, Rao GN. Effect of storage on protein concentration of tear samples[J]. Curr Eye Res, 1998, 17(10): 1027-1035.
- [5] Qu XD, Lehrer RI. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears[J]. Infect Immun, 1998, 66(6): 2791-2797.
- [6] Fullard RJ, Tucker DL. Changes in human tear protein levels with progressively increasing stimulus[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32(8): 2290-2301.
- [7] Nguyen-Khuong T, Fitzgerald A, Zhao Z, et al. Improvements for the visualization of low-molecular weight protein and peptides of human tears using MALDI[J]. Proteomics, 2008, 8(17): 3424-3432. doi: 10. 1002/ pmic. 200701161.
- [8] Zhao Z, Liu J, Wasinger VC, et al. Tear lipocalin is the predominant phosphoprotein in human tear fluid[J]. Exp Eye Res, 2010, 90(2): 344-349. doi: 10. 1016/j. exer. 2009. 11. 013.
- [9] Zhou L, Beuerman RW, Ang LP, et al. Elevation of human alpha-defensins and S100 calcium-binding proteins A8 and A9 in tear fluid of patients with pterygium [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(5): 2077-2086. doi: 10. 1167/ iovs. 08-2604.
- [10] Zhou L, Beuerman RW, Foo Y, et al. Characterisation of human tear proteins using high-resolution mass spectrometry [J]. Ann Acad Med Singap, 2006, 35(6): 400-407.
- [11] de Souza GA, Godoy LM, Mann M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors [J/OL]. Genome Biol, 2006, 7(8): R72 [2015-01-17]. http://genomebiology. com/content/7/8/R72. doi: 10. 1186/gb-2006-7-8-r72.
- [12] Tong L, Zhou XY, Zhou L, et al. Quantitation of 47 human tear proteins using high resolution multiple reaction monitoring (HR-MRM) based-mass spectrometry [J]. J Proteomics, 2014, 115: 36-48. doi: 10. 1016/j. jprot. 2014. 12. 002.
- [13] 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.
- [14] Qiu X, Gong L, Sun X, et al. Efficacy of acupuncture and identification of tear protein expression changes using iTRAQ quantitative proteomics in rabbits [J]. Curr Eye Res, 2011, 36(10): 886-894. doi: 10. 3109/ 02713683. 2011. 601843.
- [15] Razavi M, Frick LE, LaMarr WA, et al. High-throughput SISCAPA quantitation of peptides from human plasma digests by ultrafast, liquid chromatography-free mass spectrometry [J]. J Proteome Res, 2012, 11(12): 5642-5649. doi: 10. 1021/ pr300652v.
- [16] LaFrance MW, Kehinde LE, Fullard RJ. Multiple cytokine analysis in human tears: an optimized procedure for cytometric bead-based assay [J]. Curr Eye Res, 2008, 33(7): 525-544. doi: 10. 1080/ 02713680802190085.
- [17] Sack RA, Conradi L, Krumholz D, et al. Membrane array characterization of 80 chemokines, cytokines, and growth factors in open- and closed-eye tears: angiogenin and other defense system constituents [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(4): 1228-1238. doi: 10. 1167/ iovs. 04-0760.
- [18] Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, et al. In-depth analysis of the human tear proteome [J]. J Proteomics, 2012, 75(13): 3877-3885. doi: 10. 1016/j. jprot. 2012. 04. 053.
- [19] Zhou L, Beuerman RW. Tear analysis in ocular surface diseases [J]. Prog Retin Eye Res, 2012, 31(6): 527-550. doi: 10. 1016/j. pretyeres. 2012. 06. 002.
- [20] Lebrecht A, Boehm D, Schmidt M, et al. Surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry to detect breast cancer markers in tears and serum [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2009, 6(2): 75-83.

(收稿日期:2015-03-10)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

读者·作者·编者

## 本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省眼科研究所 & 河南省立眼科医院承办的眼科专业学术期刊,月刊,每月 10 日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果,主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等,学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药物学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章,欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

(本刊编辑部)