

泪液采集载体和保存温度对泪液蛋白质定量研究的影响

饶玉清¹, 黄玥², 李旌¹

基金项目: 国家自然科学基金基础研究计划-面上项目 (No. 81371063)

作者单位:¹(200092)中国上海市,上海交通大学医学院附属新华医院眼科;²(202150)中国上海市,上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院眼科

作者简介: 饶玉清, 毕业于上海交通大学, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 眼表及眼底疾病分子标记物与发病机制。

通讯作者: 李旌, 毕业于北京师范大学, 博士, 教授, 研究方向: 葡萄膜炎及眼底疾病分子标记物与发病机制. lijing@xinhua.com.cn

收稿日期: 2017-07-31 修回日期: 2018-01-03

Impact of collection methods and storage conditions on the recovery of tear proteins

Yu-Qing Rao¹, Yue Huang², Jing Li¹

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81371063)

¹Department of Ophthalmology, Xin Hua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; ²Department of Ophthalmology, Chong Ming Branch of Xin Hua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 202150, China

Correspondence to: Jing Li. Department of Ophthalmology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China. lijing@xinhua.com.cn
Received: 2017-07-31 Accepted: 2018-01-03

Abstract

• AIM: To explore the optimal ways for the collection and preservation of tear proteins.

• METHODS: Siliconized microcapillary tube or Schirmer's strips made in China or in the USA were tested. All three carriers were loaded with equal volume and quantity of bull serum albumin (BSA), fetal bovine serum (FBS) or known concentrations of IL-1Ra, IL-6, MIG, IP-10, MMP9, TIMP1, VEGF and HBD1 mixture and kept at 4°C, -20°C or -80°C. After a desired time of storage, the proteins were eluted with different elution buffer. Micro BCA™ protein quantitative kit and enzyme-linked immunosorbent assay kits were used to determine total protein concentrations and the concentrations of the above biological molecules, respectively.

• RESULTS: Neither protease inhibitors nor detergent were necessary for protein elution from the Schirmer's strip. When stored at -20°C and -80°C, three tear carriers showed no differences in the recovery of total protein. The recovery of IL-6 from three carriers under different temperature was similar but the higher than other

proteins. The recovery rate of IL-1Ra was 98%±6% from the microcapillary tube and 19%±15% from Schirmer's strip. The recovery rate of HBD1 was 93%±8% from the microcapillary tube and 61%±3% from Schirmer's strip. The recovery rate of MIG was 87%±4% from the microcapillary tube and 69%±4% from Schirmer's strip. Microcapillary tube also had less retention for MMP-9 (90%±5%) and TIMP1 (103%±7%) compared to Schirmer's strip (62%±3% vs 87%±5%). The strips made in China and in the USA showed similar retention to most of the proteins tested here. When stored at -80°C, the recovery rate for VEGF and IP-10 were 82%±5% and 72%±8%, respectively, significantly higher than that when stored at higher temperature.

• CONCLUSION: The selection of tear sample carrier is dependent on target proteins to be recovered. Low temperature deep freezing is a preferred way for tear sample storage. microcapillary tube is applicable for most of the proteins. While for those protein with noticeable polarity, like HBD1, pre-experiment is needed.

• KEYWORDS: tear protein; Shirmer's tear strip; microcapillary tube

Citation: Rao YQ, Huang Y, Li J. Impact of collection methods and storage conditions on the recovery of tear proteins. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(2):226-230

摘要

目的: 比较三种泪液采集载体(进口吸附滤纸、国产吸附滤纸和泪液采集毛细管)在不同储存温度条件下对泪液蛋白保存的影响,为科学地选择泪液采集方式、准确测定泪液中的不同类型的蛋白分子提供实验依据。

方法: 表面硅化处理的玻璃毛细管,国产泪液试纸及进口泪液试纸吸附等体积等量的血清白蛋白、胎牛蛋白或已知浓度的 IL-1Ra、IL-6、MIG、IP-10、MMP-9、TIMP1、VEGF 和 HBD1 标准品混合液后放于无菌离心管并分别保存于 4°C、-20°C 和 -80°C。以适当的洗脱液进行洗脱后,用 Micro BCA™ 和酶联免疫吸附法分别检测总蛋白浓度和各种特异性蛋白浓度。

结果: 洗脱缓冲液中是否添加表面活性剂或蛋白酶抑制剂对滤纸载体的蛋白洗脱率没有显著影响。-20°C 和 -80°C 保存条件下,三种泪液采集载体对样本总蛋白的平均洗脱率没有显著性差异。IL-6 在三种泪液采集载体中的平均洗脱率均较高,且载体之间及不同保存温度环境之间均没有显著的差异。滤纸和毛细管载体对 IL-1Ra 和 HBD1 的滞留效应差异较大: IL-1Ra 在滤纸和毛细管载体中的平均洗脱率分别为 19%±15% 和 98%±6%; HBD1 在滤纸和毛细管载体中的平均洗脱率分别为

93% ± 8% 和 61% ± 3%。MIG 在毛细管收集载体中的平均洗脱率显著高于滤纸载体,分别为 87% ± 4% 和 69% ± 4%。毛细管载体对 MMP-9 和 TIMP1 的平均洗脱率分别为 90% ± 5% 和 103% ± 7%, 同样显著高于滤纸(分别为 62% ± 3% 和 87% ± 5%)。样本载体保存于 -80℃ 环境时,其洗脱液中 VEGF 和 IP-10 的平均洗脱率分别为 82% ± 5% 和 72% ± 8%, 明显高于其他温度环境保存的样本载体。

结论:检测泪液中不同目的蛋白时,需综合考虑采集方法和保存温度条件,选择最经济可靠的方法。用毛细管采集泪液适合大多数的蛋白定量检测,检测 IL-1Ra、IP-10、MIG、MMP-9 和 TIMP1 的泪液适合用毛细管进行采集。但是对于有明显极性的蛋白,例如 HBD1,则要先试验最有效的收集和保存方法。

关键词:泪液蛋白;泪液吸附滤纸;泪液采集毛细管

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.2.05

引用:饶玉清,黄玥,李旌.泪液采集载体和保存温度对泪液蛋白质定量研究的影响.国际眼科杂志 2018;18(2):226-230

0 引言

泪液覆盖于眼表,具有屏障、润滑、杀菌及免疫调节等多种功能^[1-3]。很多眼病甚至全身性疾病都可能影响泪液的组成,泪液组份的改变也常常是导致眼表疾病的重要原因^[4]。泪液中特定蛋白质组份的定量研究已经越来越多地被用来诊断眼表疾病、判断疾病的严重程度^[5]等,并可作为预防或治疗眼表疾病的指针应用于科研和临床^[6-8]。泪液样本在科研和临床的广泛应用对于泪液的采集和保存提出了较高的要求。目前国内外比较常用的泪液采集法有毛细管采集法(microcapillary tube)、滤纸吸附法(schirmer tear strip)和海绵吸附法(ophthalmic sponge)^[9]。大家普遍认为毛细管采集法比较易于后期洗脱和分析,然而临床经验告诉我们,患者尤其是敏感性患者和儿童,容易对毛细管采集泪液产生恐惧,而对滤纸吸附法的接受程度则较好^[10]。滤纸吸附法还可同时测量泪液分泌情况,因此被广泛应用,但是滤纸吸附法的洗脱效率到底如何并不清楚。另一方面,对于泪液样本的保存条件也缺乏比较研究,尽管超低温保存是众所周知的安全选择,但事实上国内不少眼科目前仍缺乏超低温保存条件,那么其他的保存温度是否可以达到比较好的保存效果,这也是有关研究人员关心的问题之一。本研究通过对不同泪液载体在不同洗脱液和不同保存条件下的蛋白洗脱效率的比较,探索泪液采集、洗脱和保存的最理想方法。

1 材料和方法

1.1 材料 进口泪液吸附滤纸(Schirmer tear strip, HAAG-STREIT, UK;以下简称 UK strip);国产泪液吸附滤纸(天津晶明新技术开发有限公司,天津;以下简称 China strip);硅化毛细管(10μL, Microcapillary tube, Fisher, USA;以下简称 Tube);蛋白浓度检测试剂盒(Micro BCA™ Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, USA);酶联免疫吸附检测(ELISA)试剂盒(R&D Systems, Minneapolis, USA;PeproTech, Rocky Hill, USA),蛋白酶抑制剂(complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor

Cocktail Tablets, Roche, Germany);其他常用化学试剂来自 Sigma-Aldrich 公司;IL-1Ra、IL-6、MIG、IP-10、MMP-9、TIMP1、VEGF 和 HBD1 标准品来自各 ELISA 试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 蛋白样品预处理及保存 实验方法主要参照 Denisin 等^[11]的实验方法并修改而成。取 2μg/mL 牛血清白蛋白(BSA)、胎牛血清(FBS)、泪液样本或蛋白质标准品混合物(每种蛋白质分子浓度均为 500ng/mL)各 5μL 分别滴到 2cm 的无菌泪液试纸表面,自然风干后,转移到无菌离心管中,保存于 4℃、-20℃ 和 -80℃ 温度下直到需要洗脱检测时取出。对于毛细管而言,首先将上述 5μL 蛋白质溶液滴到封口膜上面,再用毛细管吸取,上端折断后放入无菌离心管中,同样保存于不同温度下直到下一步实验。

1.2.2 样本洗脱 滤纸载体用干净小手术剪剪碎后,加入 300μL 洗脱缓冲液,室温震荡 5h 洗脱。对于在毛细管保存的样本,直接加入 300μL 洗脱缓冲液,室温震荡 5h 洗脱。

1.2.3 蛋白质浓度测定

1.2.3.1 泪液中总蛋白质浓度测定 使用 Micro BCA™ Protein Assay Kit 检测洗脱液中总蛋白的浓度,检测步骤按照说明书进行,使用 BioteKμQuant 微孔板酶标仪检测 562nm 处波长的吸光度值,通过计算总蛋白量测定值和实际上样总蛋白量的比值得到相应的总蛋白洗脱率。同一样本重复测试 3 个孔。

1.2.3.2 特异性蛋白质浓度的测定 检测操作步骤按照 IL-1Ra、IL-6、MIG、IP-10、MMP-9、TIMP1、VEGF 和 HBD1 ELISA 试剂盒说明书进行,使用 BioteKμQuant 微孔板酶标仪检测相应波长的吸光度值,通过计算洗脱液中总蛋白量的测定值和实际上样总蛋白量的比值得到进口泪液吸附纸、国产泪液吸附纸以及毛细管对 IL-1Ra、IL-6、MIG、IP-10、MMP-9、TIMP1、VEGF 和 HBD1 在不同储存温度条件下的洗脱率。同一样本重复测试 3 个孔。

统计学分析:应用 SPSS19.0 统计软件,本实验所有的实验均重复 3 次以上,并将所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,组间比较应用单因素 ANOVA 及独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同洗脱缓冲液组份对样本载体中总蛋白洗脱率的影响 我们以 PBS 为洗脱缓冲液的基础成分,比较表面活性剂和蛋白酶抑制剂对于蛋白从泪液试纸中洗脱的影响。在将同等浓度和体积的 BSA 和 FBS 分别滴注到国产和进口泪液试纸后,然后分别用 PBS 以及 PBS 中添加 1g/L Tween-20 或 1g/L Triton X-100 的洗脱缓冲液同等条件下洗脱,发现三者对蛋白洗脱效率均无显著影响,差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

我们同时检测蛋白酶抑制剂(PI)对样本泪液中特定的蛋白因子浓度测定的影响,结果见表 2。洗脱液中加入蛋白酶抑制剂后对样本中 IL-1Ra 的浓度测定有显著影响($P < 0.05$),但是对于 IL-6、IP-10 和 VEGF 没有影响。考虑到表面活性剂和蛋白酶抑制剂的存在可能干扰蛋白的结合和相互作用,继而影响洗脱后实验,因此在以下的试验中我们只用 PBS 作为洗脱缓冲液。

表1 不同洗脱缓冲液对样本载体中BSA和FBS洗脱率的比较

洗脱缓冲液	重复次数	BSA 平均洗脱率	FBS 平均洗脱率
PBS	6	0.97±0.02	0.98±0.04
PBS+1g/L Tween-20	6	1.05±0.16	1.01±0.14
PBS+1g/L Triton X-100	6	1.08±0.19	1.03±0.08
<i>P</i>		0.085	0.227

表2 蛋白酶抑制剂对样本中蛋白质标准品浓度测定的影响

泪液蛋白	洗脱缓冲液	重复	平均浓度($\bar{x}\pm s$, pg/mL)	<i>P</i>
IL-1Ra	不含 PI	15	9.35±5.77	<0.001
	含有 PI	15	20.97±6.88	
IL-6	不含 PI	15	65.12±143.9	0.851
	含有 PI	15	75.76±163.38	
IP-10	不含 PI	15	529.04±508.46	0.425
	含有 PI	15	696.41±618.92	
VEGF	不含 PI	15	66.22±31.33	0.864
	含有 PI	15	64.06±36.87	

表3 三种不同泪液采集载体在不同温度条件下对BSA和FBS总蛋白平均洗脱率的比较

温度	BSA 洗脱率			FBS 洗脱率		
	UK strip	China strip	Tube	UK strip	China strip	Tube
4℃	0.95±0.05	0.99±0.08	0.98±0.07	0.97±0.06	0.91±0.06	0.97±0.06
-20℃	1.03±0.06	1.03±0.04	0.93±0.1	0.99±0.06	0.98±0.04	0.96±0.04
-80℃	0.94±0.09	0.95±0.11	0.99±0.13	0.94±0.12	0.97±0.06	0.98±0.05

注:UK strip:进口泪液吸附滤纸;China strip:国产泪液吸附滤纸;Tube:泪液采集毛细管。

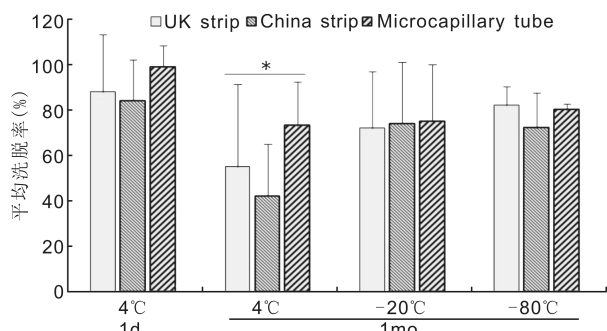


图1 三种不同泪液采集载体对泪液样本总蛋白平均洗脱率的比较 * :进口滤纸、国产滤纸和毛细管对泪液总蛋白的平均洗脱率相比较, $P<0.05$ 。

2.2 不同泪液吸附纸以及毛细管洗脱率的比较 我们进一步检测3种载体在不同温度条件下保存4wk后其总蛋白的洗脱效果。实验中所有载体均分别吸附等体积、总蛋白浓度相等的BSA、FBS和泪液样本,洗脱实验结果表明这3种载体中BSA和FBS总蛋白的平均洗脱率均在90%以上,且互相之间差异无统计学意义($P>0.05$,表3)。

我们同时也检测了3种载体吸附泪液样本后,在4℃下保存1d以及在不同温度条件下保存4wk后泪液总蛋白的洗脱效果。三种载体中泪液总蛋白的平均洗脱率在低温储存环境下(-20℃和-80℃)没有显著差异,但在4℃环境下差异有统计学意义($P<0.05$,图1)。

2.3 泪液样本的采集方式和保存温度条件对不同泪液蛋白平均洗脱率的影响 为进一步了解不同载体对于泪液中不同类型生物活性分子的洗脱效率的影响,我们选择

了8种存在于泪液并在不同眼表疾病中具有代表性的蛋白作为代表测定3种不同载体及保存温度对其影响,该8种分子分别为:细胞因子(IL-1Ra和IL-6),趋化因子(MIG和IP-10),分泌的基质金属蛋白酶MMP-9及其抑制物TIMP1,内源性抗生素HBD1以及生长激素VEGF。

IL-6为所有实验组中检测结果最稳定的一个蛋白,泪液载体和保存温度对其洗脱效率均无显著影响($P>0.05$),洗脱率均高于80%。IL-1Ra在毛细管的平均洗脱率为90%以上,且不受保存温度影响($P>0.05$),而在两种泪液滤纸中其平均洗脱率均低于50%。毛细管中保存的MIG洗脱效率最高,为87%±4%,且与保存温度没有明显相关性。然而滤纸中保存的MIG其洗脱率明显低于毛细管。无论采用何种采集方法和保存温度,IP-10的洗脱率均低于MIG。其中毛细管采集并保存于-80℃条件下,IP-10的洗脱率最高,为78%±5%。保存的温度条件明显影响IP-10的洗脱率,在4℃时,滤纸采集的IP-10其平均洗脱率为27%±5%,见图2。

大分子量分泌蛋白MMP-9的最高洗脱率见于在-80℃保存的毛细管。实验结果表明毛细管保存的MMP-9其洗脱率不受保存温度的影响,平均洗脱率为90%±5%。然而实验采用的进口滤纸保存的MMP-9无论何种温度条件,其洗脱率均低于其他样本载体,4℃保存时仅为33%±4%。TIMP1的实验结果与MMP-9相似,使用毛细管进行保存时,其洗脱率不受保存温度的影响,平均洗脱率接近100%。但滤纸保存的TIMP1其洗脱率受温度的影响较大,在4℃保存时平均洗脱率为64%±2%,见图3。

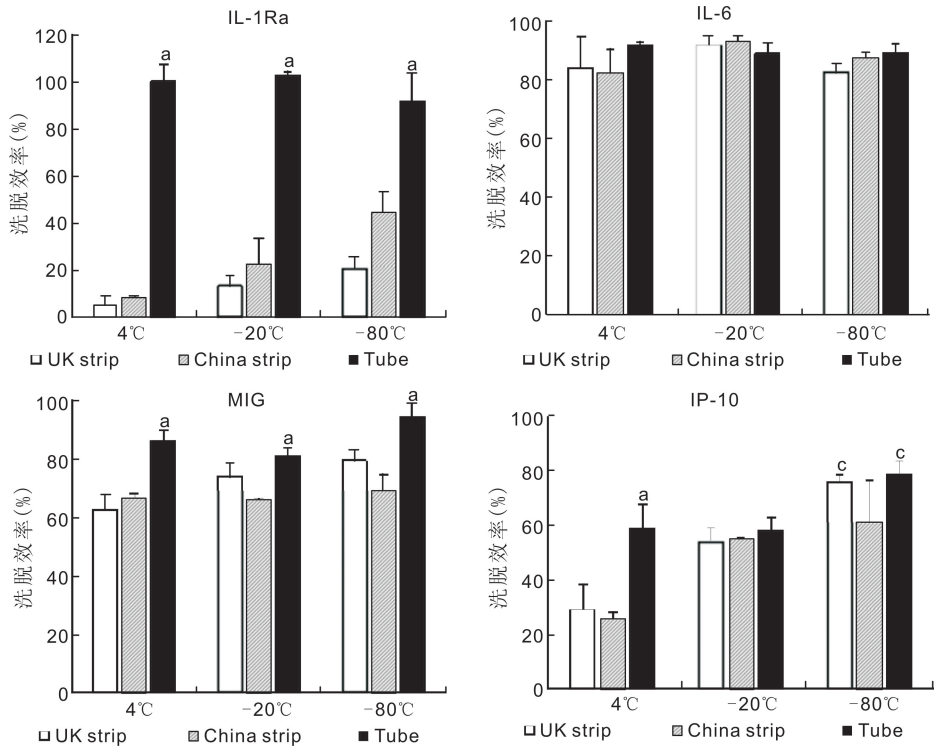


图2 细胞因子和趋化因子经3种泪液采集方法采集后在不同的储存温度条件下保存1mo后洗脱率的比较 ^a $P < 0.05$ vs 进口滤纸、国产滤纸; ^b $P < 0.05$ vs 国产滤纸。

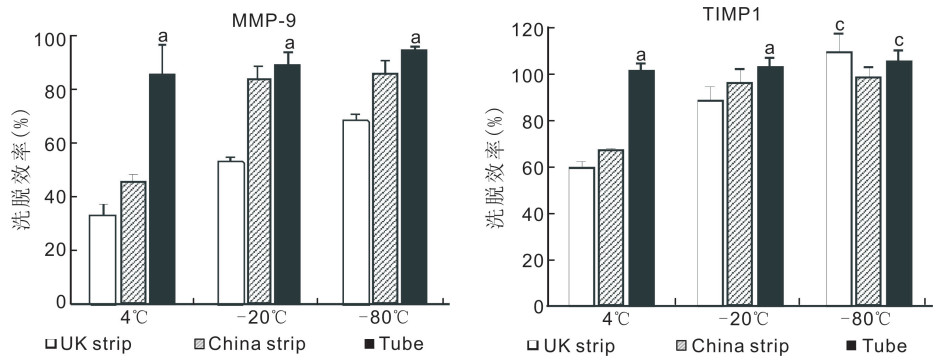


图3 大分子量细胞外分泌蛋白 MMP-9 及其抑制物 TIMP1 经3种泪液采集方法采集后在不同的储存温度条件下保存1mo后洗脱率的比较 ^a $P < 0.05$ vs 进口滤纸、国产滤纸; ^b $P < 0.05$ vs 国产滤纸。

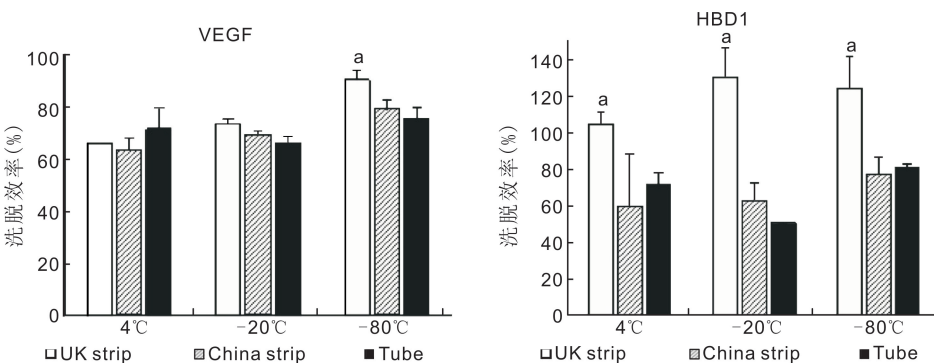


图4 血管内皮细胞生长因子(VEGF)和1型防御素(HBD1)经3种泪液采集方法采集后在不同的储存温度条件下保存1mo后洗脱率的比较 ^a $P < 0.05$ vs 国产滤纸、毛细管。

VEGF 在采用3种泪液采集方法并保存于4°C和-20°C的样本进行检测时,其洗脱效率无差异。而保存于超低温环境下(-80°C),并采用进口 Schirmer strip 滤纸采集的样本中,VEGF 蛋白洗脱效率(90%±8%)明显优于国产 Schirmer strip 滤纸和毛细管采集的样本,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

强阳离子型多肽 HBD1 在国产 Schirmer strip 滤纸和

毛细采集管两种载体中显示出明显的滞留效应,平均洗脱效率分别为 67%±9.2%、68%±0.15%,而使用进口泪液吸附纸采集的样本进行检测时,平均洗脱率明显优于前两者,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图4。

3 讨论

本文就洗脱缓冲液组成、泪液采集载体、泪液保存温度3个方面分析了泪液采集和保存对泪液蛋白质浓度检

测的影响。我们的结果表明,泪液蛋白从收集载体中进行洗脱可以用 PBS 在常温下进行,表面活性剂对于提高蛋白从泪液采集载体中的洗脱率没有显著作用,这可能与所选择的待测目的蛋白属于水溶性生物大分子有关。而洗脱缓冲液中加入蛋白酶抑制剂则会干扰对某些细胞因子的定量检测,如 IL-1Ra。实验结果同时表明泪液样本的保存温度条件对于泪液蛋白的平均洗脱率有一定的影响,尤其是 4℃ 保存的情况下。4℃ 温度环境下,三种泪液采集载体的总蛋白洗脱率有显著差异,因此需要严格避免样本在 4℃ 的长期存放。在 -20℃ 和 -80℃ 的条件下,无论使用何种载体,都表现 20% ~ 30% 的洗脱率的下降,三种泪液采集载体之间没有显著差异,因此从泪液总蛋白平均洗脱率的影响来讲,-20℃ 保存是可以接受的。

尽管本实验中所用的 3 种载体在 BSA 和 FBS 总蛋白保存和洗脱率方面没有显著性差异,但是当我们用特异的生物活性分子进行实验时,却发现不同载体对于不同分子的洗脱率有明显影响,证实了 Denisin 等^[11]的实验结果。实验结果还表明玻璃毛细管对 HBD1 有明显的滞留效应。HBD1 是一种内源性抗菌多肽,分子量为 3.9kDa,带有 1 个精氨酸,3 个赖氨酸,使整个分子带明显正电荷^[12]。相比于其他的蛋白质分子,毛细管载体对样本中的 HBD1 的滞留效应更加明显,我们认为造成这种结果的主要原因可能在于硅化玻璃管壁容易吸附带正电的分子,因此毛细管载体不适合用于 HBD1 的定量检测。IL-1Ra 在 3 种载体中的洗脱率则与 HBD1 相反,两种滤纸载体均对 IL-1Ra 有明显的滞留效应,因此对泪液中 IL-1Ra 蛋白质分子进行定量检测时,只能使用毛细管载体收集泪液样本。本实验所试验的进口和国产两种滤纸仅在 MMP-9 和 HBD1 的洗脱率有明显区别,其他检测的蛋白质分子在进口和国产两种滤纸载体中的平均洗脱率没有明显差别。

IL-6 和 VEGF 是广泛研究的一种炎症相关蛋白质分子。IL-6 具有调节免疫应答、急性期反应等功能。泪液中 IL-6 的浓度水平是眼表炎症状态的重要指标^[13]。实验中发现 IL-6 在 3 种泪液采集载体中的平均洗脱率均较高,且载体之间及不同保存温度环境之间均没有显著的差异。血管内皮生长因子 VEGF 具有促进组织血管增生、炎症反应和组织修复的功能。在 4℃ 和 -20℃ 条件下,VEGF 在三种泪液采集载体的平均洗脱率无明显差异。以上表明 IL-6 和 VEGF 具有热稳定性与低吸附性等分子特性,对泪液中 IL-6 和 VEGF 蛋白质的定量检测分析具有指导意义。趋化因子同样是泪液中调节炎症反应的重要蛋白质分子,具有分子量小、同源性高等结构特点^[14]。本实验选择 MIG 和 IP-10 这两个趋化因子蛋白作为代表来进行研究,发现两者在滤纸载体和毛细管载体中的平均洗脱率均有显著差异。毛细管载体对 MIG 和 IP-10 的滞留效应均明显小于滤纸载体,提示对泪液中趋化因子进行定量检测时,最好使用毛细管载体采集泪液样本。

本实验也发现尽管泪液总蛋白的洗脱率在保存 1mo 后只有 70% ~ 80% 的水平,但是某些具体的蛋白,如 IL-6 和 TIMP1 其洗脱率可以达到 80% 以上,而另外的一些蛋白例如 VEGF 和 IP-10,其总体洗脱率均为 80% 以下,无论采用何种载体或保存温度。我们觉得这除了与不同蛋白质在不同温度下的稳定性以及样本载体对不同蛋白质滞留效应不同有关系外,还与泪液中特有的黏蛋白和糖蛋白具有比某些生物活性分子更大的滞留效应有关^[15]。

综上所述,-20℃ 低温冰箱在短期保存中其效果与 -80℃ 超低温冰箱基本一致。在选择泪液采集和保存的方法时,需要针对所检测的泪液蛋白选择合适的载体及保存条件。

参考文献

- 1 Leonardi A. Allergy and allergic mediators in tears. *Exper Eye Res* 2013;117:106-117
- 2 Torres PF, Kijlstra A. The role of cytokines in corneal immunopathology. *Ocul Immunol Inflamm* 2001;9(1):9-24
- 3 Cook EB. Tear cytokines in acute and chronic ocular allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4(5):441-445
- 4 Zhou L, Beuerman RW. Tear analysis in ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res* 2012;31(6):527-550
- 5 Acera A, Vecino E, Duran JA. Tear MMP-9 levels as a marker of ocular surface inflammation in conjunctivochalasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(13):8285-8291
- 6 Enriquez-de-Salamanca A, Bonini S, Calonge M. Molecular and cellular biomarkers in dry eye disease and ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;12(5):523-533
- 7 Ananthi S, Chitra T, Bini R, et al. Comparative analysis of the tear protein profile in mycotic keratitis patients. *Mol Vis* 2008;14:500-507
- 8 崔卫东,吕寅峰. 应用 SELDI-TOF-MS 技术分析 VKC 泪液的差异表达蛋白. *放射免疫学杂志* 2012;25(3):307-310
- 9 Inic-Kanada A, Nussbaumer A, Montanaro J, et al. Comparison of ophthalmic sponges and extraction buffers for quantifying cytokine profiles in tears using Luminex technology. *Mol Vis* 2012;18:2717-2725
- 10 Posa A, Brauer L, Schicht M, et al. Schirmer strip vs. capillary tube method; non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. *Ann Anat* 2013;195(2):137-142
- 11 Denisin AK, Kams K, Herr AE. Post-collection processing of Schirmer strip-collected human tear fluid impacts protein content. *Analyst* 2012;137(21):5088-5096
- 12 Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(9):710-720
- 13 Zahir-Jouzani F, Atyabi F, Mojtabavi N. Interleukin-6 participation in pathology of ocular diseases. *Pathophysiology* 2017;24(3):123-131
- 14 Carreño E, Portero A, Herreras JM, et al. Cytokine and chemokine tear levels in patients with uveitis. *Acta Ophthalmol* 2017;95(5):e405-e414
- 15 Shimazaki - Den S, Dogru M, Higa K, et al. Symptoms, visual function, and mucin expression of eyes with tear film instability. *Cornea* 2013;32(9):1211-1218