

泪液蛋白质组学分析在眼部疾病中的应用及研究进展

伍满, 谭亭, 王平

引用: 伍满, 谭亭, 王平. 泪液蛋白质组学分析在眼部疾病中的应用及研究进展. 国际眼科杂志 2021;21(4):656-659

作者单位: (443000) 中国湖北省宜昌市三峡大学附属仁和医院眼科

作者简介: 伍满, 女, 三峡大学硕士研究生, 研究方向: 眼科学。

通讯作者: 王平, 医学硕士, 三峡大学教授, 三峡大学附属仁和医院院长, 眼科学带头人. 272593422@qq.com

收稿日期: 2020-07-03 修回日期: 2021-02-25

摘要

泪液由泪腺及副泪腺分泌, 主要通过眼睑和瞬目运动构成泪膜的水样层。泪液的蛋白质组学等研究是当前面临的难点也是热点, 其主要目的是研究眼部疾病甚至部分全身疾病的代表其特异性和高敏感性的易检测出的生物标志物, 以提高临床疾病的诊断和监测, 还可通过识别疾病的靶点促进个性化治疗以及改善预后, 并可以设计有针对性的后续实验了解疾病分子机制。在眼部疾病和部分全身疾病中或比血液、尿液、脑脊液等现有常规体液检查更有应用前景的标本检测。目前大量研究表明很多疾病在泪液中有成分的变化, 本文就应用蛋白质组学的方法探讨眼部疾病在泪液中的蛋白质成分变化进行综述。

关键词: 泪液成分; 蛋白质组学; 眼部疾病; 泪液收集; 泪液保存

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.4.18

Application and research progress of tear proteomics analysis in ocular diseases

Man Wu, Ting Tan, Ping Wang

Department of Ophthalmology, Affiliated RenHe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei Province, China

Correspondence to: Ping Wang. Department of Ophthalmology, Affiliated RenHe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei Province, China. 272593422@qq.com

Received: 2020-07-03 Accepted: 2021-02-25

Abstract

• Tears are secreted by lacrimal and accessory lacrimal glands, mainly through eyelid and blink movement to form the watery layer of tear film. Tear proteomics is a difficult and hot topic whose main purpose is to detect high sensitive and specific biomarkers representing eye diseases or even systemic diseases so as to facilitate diseases diagnosis and assessment, as well as to achieve

personalized treatment, improve prognosis, and design targeted follow-up experiments to understand the molecular mechanisms of the disease. It may have wider application prospects in eye diseases and some systemic diseases compared to existing routine fluid examinations such as blood, urine, and cerebrospinal fluid tests. Numerous studies have shown that many diseases have changes in the composition of tears. In this paper, we will review the progress of proteomics used to investigate the changes of the protein components of tears in different eye diseases.

• **KEYWORDS:** tear component; proteomics; eye diseases; tear collection; tear preservation

Citation: Wu M, Tan T, Wang P. Application and research progress of tear proteomics analysis in ocular diseases. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(4):656-659

0 引言

泪液是由多种成分构成的混合物, 其中任何成分的质或量的变化或可提示疾病的发生、发展, 近年来越来越多的研究者聚焦于泪液标本的研究, 以此来探寻相关疾病。目前研究表明, 泪液由水和蛋白质、电解质、糖类、有机酸、核苷酸、甾醇、维生素、脂类、碳水化合物及其它低分子量和高分子量化合物等组成, 水约占其中的 98%~99%^[1-2]。泪液各个成分的相对稳定维持着眼部的健康, 同时泪液成分的变化也受眼部疾病的影响, 如 Kalló 等^[3]研究的糖尿病眼部并发症及甲状腺相关疾病等都可引起泪液成分的变化, 泪液作为非侵袭性的检测体液的理想材料, 近年来引起了广泛的关注, 学者们研究了其在眼部疾病中的变化, 现将应用蛋白质组学研究方法分析泪液成分变化及其与眼部疾病的关系进行综述^[4]。

1 泪液标本的收集与保存

泪液的收集方法对标本的影响较大, 所以, 采用正确的收集方法对结果的可靠性至关重要。为了尽量减少对泪液成分的影响, 采集时多采用无麻醉且无刺激下收集, 目前收集泪液标本的方法多为以下几种, 即玻璃微毛细管收集^[5-6]、Schirmer 试纸收集、吸收性滤纸片及纤维素海绵、棉线^[4,7]; 玻璃微毛细管是从眼外直接抽吸眼液。它被认为是避免反射性泪液分泌的最佳方法^[8]。但是, 处理时需要足够的经验和技巧, 并且很耗时。因此, 在实验研究或临床应用中是有局限性的, 如涉及儿科人群时。此外, 对于焦虑或不合作的患者, 都将引起不可靠的结果; Schirmer 试纸在干眼症的诊断中是一种简便而快捷的眼泪收集方法, 也适用于临床常规检查^[9]。纸带被放置在每只眼睛的下穹窿中, 并留在原处, 直到纸带被润湿到控制线为止。但是, 试纸条可能会引起强烈刺激, 从而导致不必要的分析物稀释; 海绵是从眼外收集泪液, 大多患者可

以很好地耐受,此外,海绵可以标准化收集眼泪体积,将不同材料的海绵和各种提取缓冲液进行组合和测试,以优化泪液收集方法并克服最常见的局限性,但是很难比较结果,另一个主要问题是某些细胞因子与海绵紧密结合,在提取过程中造成困难,用这种方法也可能发生眼泪反射,导致不必要的稀释^[10];有研究报道另一种适用于泪液较少的患者的方法:眼泪冲洗技术(具体操作方法是 将 50~60 μ L 平衡盐液冲洗眼睑至眼睑褶皱,用无菌塑料微管快速收集眼泪)^[11]。此外,最新研究报道了一种与眼前表面接触的尖端[眼前接触尖端(PCT)]以使对眼表面的损害最小化的收集泪液的方法,报道称此比玻璃毛细管损伤更小^[12],但目前使用玻璃毛细管收集眼泪仍是最常用的、避免眼泪反射的最佳采样方法^[13]。标本的保存对成分的影响同样重要,目前研究推荐泪液标本的保存温度包括 -80 $^{\circ}$ C、-70 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C 以及 4 $^{\circ}$ C^[3, 14-17],深低温冻是泪液样品存储的首选方式^[15]。

2 泪液蛋白质组学

蛋白质组学是澳大利亚科学家于 1994 年提出的^[18],起初多被用于肿瘤标记物的测定^[19],后逐渐用于眼部疾病^[20-23],其过程主要包括蛋白质的分离、鉴定及相互作用,实现手段包括多维色谱法(如离子交换色谱法等)、多维电泳技术(如二维凝胶电泳等)、亲和法(如免疫印记法等)、细胞器、膜复合体分离、氨基和羧基末端分析、质谱法(如肽片段质谱及串联质谱)、免疫共沉淀、酵母双杂交系统、蛋白质芯片技术等,其中质谱法是应用较为前沿的一种常用技术^[24]。泪液分析是一种新的诊断疾病的方法,有研究表明,应用蛋白质组学在泪液中发现了 1543 种蛋白质,其鉴定的错误率小于 1%,这是目前报道的最多的泪液中存在的蛋白质数量,其中溶菌酶(2~4mg/mL)、乳铁蛋白(1.2~3mg/mL)和脂钙素(1~2mg/mL)是含量最高的蛋白质^[25]。蛋白质在眼部起着重要生物功能,如抗炎(如溶菌酶可裂解细菌的细胞壁)、抗病毒、参与免疫反应、凝血过程、能量反应过程、氧化应激反应、变态反应、予结膜角膜等提供营养和生长因子^[26]参与眼表组织损伤重塑,与泪膜中的脂质不可逆结合,参与泪膜表面张力形成、流变学和动力学等^[25]。

3 蛋白质组学在眼部疾病中的应用

3.1 干眼 眼泪中的蛋白质对维护眼表功能具有重要作用,而眼泪成分的质和量的变化都反映了眼表健康状况,据报道称干眼的发病率目前已从 2% 上升到 50% 以上^[27],影响着全球一半人的眼表健康,且仍有继续增加的趋势,现已有较多研究应用蛋白质组学的方法发现干眼患者中存在许多蛋白质的变化,如 Jung 等^[28]研究发现干眼患者的泪液中蛋白的最大数量为 1700 种,比健康人群的 1500 多种多出 100 余种,并认为干眼最重要的发病机制为泪液中异常蛋白质引起的免疫炎症反应。不同原因导致的干眼蛋白质变化不同,Perumal 等^[27]表示在大多干眼患者泪液中普遍存在 S100-A8 蛋白显著增加的现象,且富含脯氨酸的蛋白 4、溶菌酶 C(LYZ)及蛋白 3 和 α -1-抗胰蛋白酶的蛋白质含量也增加,而细胞外糖蛋白、 α -烯醇化酶、血清转铁蛋白、磷脂酰乙醇胺结合蛋白 1、 α -1-酸性糖蛋白 1、醛脱氢酶等蛋白质则存在降低现象;在泪液缺乏型干眼中则主要是表达免疫应答的蛋白质功能降低了,而表达炎症反应,分解代谢过程,细胞死亡,创伤反应等的蛋白质数量明显增加;Aluru 等^[29]发现在继发于类风湿关节炎

的干眼中,80% 以上的病例中都显示核糖核酸酶 p 蛋白亚基 20、原钙黏蛋白和异核糖核蛋白 q 亚型 6 表达下调,而二磷酸腺苷核糖基转移酶 5 抗体、RhoGTP 酶等蛋白表达则上调,而半乳凝素 3 降低^[30],Nod-1 蛋白的表达是增加的^[31],Aqravi 等^[32]的研究也认为干眼的发生与患者泪液中 DNA 裂解酶、重组人过氧化物还原酶 3、钙离子依赖性的磷脂结合蛋白酶 1、顺乌头酸合酶、LIM 域特有蛋白 7 等的蛋白升高有明显关系。干眼患者泪液中蛋白质的变化量庞大复杂,目前尚无一致结论,大部分蛋白质的变化与炎症及免疫反应有关^[33-36],这或可提示着干眼的病因治疗更侧重于抗炎及免疫调节。

3.2 睑缘炎 睑缘炎因其缺乏早期诊断依据,在临床上治疗相对困难,研究表明,睑缘炎患者的泪液成分也有改变,如 Kim 等研究表示运用二维电泳技术发现睑缘炎患者与健康患者泪液成分相比,血清白蛋白前体、 α -1 抗胰蛋白酶、催乳素、溶菌酶、催乳素诱导蛋白、胱抑素-SA III、丙酮酸激酶及一种未命名的蛋白质的表达都至少下调了 50%^[37],而 Song 等^[38]则发现慢性睑缘炎患者泪液中分泌型 II 型 PLA2 活性显著高于正常对照组,并表明此酶可增加磷脂的水解而降低泪膜的稳定性,睑缘炎泪液成分的变化或可给予其早期诊断提供新指标,但其泪液成分变化的研究尚少,其机制及意义有待进一步详细研究。

3.3 结膜松弛 对于结膜松弛的患者以泪液做标本应用蛋白质组学的研究尚少,有研究应用蛋白质印迹等技术在结膜松弛患者的泪液中鉴定出一系列蛋白质表达上调,例如 S100A4、S100A8 和重组人过氧化物还原酶-5 等,且这些蛋白被认为是炎症和氧化过程的标志物,以此猜测其表达水平可能有助于评估疾病的严重程度和进展^[39],但结膜松弛的发病机制是否与泪液中的蛋白质变化相关,可以从机制中阻断该疾病的发生发展,这些仍是目前存在的问题。

3.4 角、结膜炎 角、结膜炎在临床上极其常见,严重影响患者视力,现已有大量研究表示了该疾病存在明显的泪液成分变化,Li 等^[40]研究表明在过敏性结膜炎患者的泪液中发现其总蛋白浓度及一些主要的泪液蛋白成分增加,如脂蛋白相关磷脂酶 A2 的含量升高,而 Leonardi 等^[41]通过 iTRAQ 定量蛋白质组学研究发现,春季角结膜炎患者泪液标本中血清白蛋白、转铁蛋白和血红蛋白的水平比对照泪液水平高 100 倍,并表示其与疾病的严重程度相关,同时其血红素、转铁蛋白、乳球蛋白 β 和分泌球蛋白表达明显增加,而在局部使用环孢素或皮质类固醇激素治疗后其泪液样本中这些蛋白质水平则明显降低,该结果提示其中某些蛋白质的变化与该疾病有一定相关性。在热带地区,曲霉菌和镰刀菌更易感染导致霉菌性角膜炎,Parthiban 等^[42]认为在对曲霉菌感染的患者的泪液标本进行分析时发现, α -1 抗胰蛋白酶、载脂蛋白、结合珠蛋白- α 链、结合珠蛋白- β 链、乳铁蛋白及白蛋白随疾病进展表达量增加,而催泪蛋白前体、胱抑素 SN 前体和锌 α -2 糖蛋白(ZAG)在晚期则表达下调,且 ZAG 存在于疾病整个过程,同时在镰刀菌感染患者中 ZAG 也出现了变化,该研究提示在疾病早期就可通过检测 ZAG 的水平作用检测黄曲霉菌或镰刀菌的感染,提示了解 ZAG 在其中的作用对角、结膜炎可能会带来新的早期诊断标准及干预措施。

3.5 圆锥角膜 圆锥角膜(keratoconus, KC)是一种进行性角膜变薄疾病,与重要的组织重塑和多种信号网络的激活

有关,该病的病因尚不清楚,治疗困难,所以探讨其致病因素将对临床有重要意义。Yenihayat 等^[43]通过荧光 2D 凝胶电泳与 MALDI-TOF/TOF 联用研究发现圆锥角膜患者的泪液中的血清清蛋白、角蛋白 II 型细胞骨架 1、免疫球蛋白 γ -1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、 α -1 抗胰蛋白酶和载脂蛋白 A1 等表达出现下调,但溶菌酶 C、角蛋白 I 型细胞骨架 10 和脂蛋白的表达则出现上调现象,以此研究者推测这些蛋白将参与圆锥角膜形成重要步骤;Pannebaker 等^[44]应用质谱等方法研究也发现在圆锥角膜患者的泪液标本中都出现了基质金属蛋白酶-1 的表达增加,且推测与其相关的一些特征性蛋白质,其中包括几种角蛋白、免疫球蛋白 α 和 κ 、催乳素的前体、溶菌酶 C 和脂蛋白等,但具体与圆锥角膜的病因的相关性仍待进一步探讨。另一方面 Balasubramanian 等^[45]应用电泳、质谱、光谱技术等方法研究 KC 泪液标本,发现患者的泪液中组织蛋白酶 B 的水平上调了 3 倍,而聚合免疫球蛋白受体则约下调了 9 倍之多,纤维蛋白原 α 链下调约 8 倍,胱抑素 S 和胱抑素 SN 则下调约 2 倍,且研究者还发现角蛋白 1 型细胞骨架 14 和角蛋白 2 型细胞骨架 5 仅存在于 KC 患者的泪液中,而其在 KC 的病理生理过程中具体扮演什么角色尚不可知,但发现蛋白酶抑制剂的减少和蛋白酶的增加提示了 KC 的潜在分子机制,通过蛋白质机能途径分析还发现,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原态衍生物(NADHX)修复途径参与了 KC 过程,而 NADHX 是几种脱氢酶的抑制剂,影响大多正常生理过程,这或是 KC 形成的重要步骤,同时为 KC 的治疗及预防提示了新方向^[46]。

3.6 葡萄膜炎 对于葡萄膜炎患者的泪液标本做蛋白质组学研究极少,少量报道了特发性关节炎儿童葡萄膜炎患儿以眼泪为标本行液相色谱-串联质谱等方法,发现标本中含有 SEMA3G, TIMP1, HEXB, ERN1 和 SAA1 等具有较高的与性关节炎相关的蛋白质的表达,但具体关联尚待继续探讨^[47]。

3.7 青光眼 青光眼是全球不可逆性失明的主要原因之一,早期诊断仍是主要挑战。有报道以患者泪液为标本应用蛋白质组学做相关研究,结果显示原发性开角型青光眼与对照组相比,发现其中的差异蛋白,且这些蛋白与炎症反应、自由基清除、细胞间信号传导和相互作用有关,以此推测泪液中表达的相关炎症的蛋白质可能是原发性开角型青光眼潜在的生物标志物^[48],还有研究者发现,长期使用相关抗青光眼药物的患者眼泪标本,与非药物治疗组比较,S100-A8、S100-A9、乳铁蛋白 B 和 14-3-3 ζ/δ 的泪液水平显著增加,局部药物治疗不到 1a 的泪液中显示富含脯氨酸的 4 蛋白水平降低,使用局部抗青光眼药物治疗时间超过 1a 可能会引起眼表的炎症反应,该结果对抗青光眼的药物治疗具有一定指导意义^[49],也为青光眼发病机制研究提供了新方向。

3.8 甲状腺相关眼病 甲状腺相关眼病(thyroid associated ophthalmopathy, TAO)泪液的蛋白质谱分析主要表现为血清白蛋白和免疫球蛋白 κ 链 C 区的明显降低和补体 C3 几乎完全缺失以及血浆白蛋白的减少,从而降低了细胞外的抗氧化及防御,而氧化应激反应不但引起严重的组织损伤,也加速炎症的进展,补体 C3 是三条补体激活途径的重要组成部分,但在关于免疫球蛋白 κ 区 C 链的减少,如何影响 TAO 的机制仍待进一步研究^[50]。还有研究者经过 SDS-PAGE 凝胶电泳发现 TAO 患者泪液标本中溶菌酶

C、乳铁蛋白等表达均上调,这可能分别预示着眼眶和泪腺的免疫性炎症的进程及氧化应激反应的发展。并且研究认为两者在防止细菌入侵方面具有协同作用,并猜测两者在 TAO 发病的免疫机制中可能存在着协同的作用^[51]。

4 总结与展望

随着蛋白质组学研究技术的发展,为眼部疾病的病因研究及治疗提供了新思路,可以更准确地测定泪液成分变化与疾病密切相关的特征性改变,为疾病的诊断及药物疗效的评价提供依据,我们可以以此为思路用于更多的疾病研究,探索其他眼部疾病乃至全身疾病在泪液成分中的特征性改变,泪液标本或可成为常规体液检查,这或可比现有的检查方法更方便、无创、快速,对泪液标本的探索将对眼部疾病的临床诊断和治疗带来巨大的革新。

参考文献

- 1 阎慧, 赵少贞. 泪液的相关研究与进展. 眼科研究 2009;27(7):633-636
- 2 Butovich IA. On the lipid composition of human meibum and tears: comparative analysis of nonpolar lipids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(9):3779-3789
- 3 Kalló G, Emri M, Varga Z, et al. Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer's Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers. *PLoS One* 2016;11(6):e0158000
- 4 Di Zazzo A, Micera A, De Piano M, et al. Tears and ocular surface disorders: Usefulness of biomarkers. *J Cell Physiol* 2019;234(7):9982-9993
- 5 Balasubramanian SA, Mohan S, Pye DC, et al. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol* 2012;90(4):e303-e309
- 6 Willcox MD, Zhao Z, Naduvilath T, et al. Cytokine changes in tears and relationship to contact lens discomfort. *Mol Vis* 2015;21:293-305
- 7 Van Haeringen NJ. Clinical biochemistry of tears. *Surv Ophthalmol* 1981;26(2):84-96
- 8 Eonardi A, Borghesan F, Faggian D, et al. Microarray-based IgE & detection in tears of patients with vernal keratoconjunctivitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2015;26:641-645
- 9 Imura T, Yamagami S, Noma H, et al. Specific IgE for wheat in tear fluid of patients with allergic conjunctivitis. *Cutan Ocul Toxicol* 2015;34:25-34
- 10 Castelli S, Arasi S, Pawankar R, et al. Collection of nasal secretions and tears and their use in allergology. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2017;17:1-9
- 11 Micera A, Di Zazzo A, Esposito G, et al. Quiescent and active tear protein profiles to predict vernal keratoconjunctivitis reactivation. *Biomed Res Int* 2016;2016:9672082
- 12 Lee SH, Cho YC, Nam DY, et al. Designing Minimally Invasive Preocular Contact Tips for Potential Application in Tear Collection. *Cornea* 2018;37(9):1163-1168
- 13 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
- 14 Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, et al. In-depth analysis of the human tear proteome. *J Proteomics* 2012;75(13):3877-3885
- 15 Pieragostino D, D'Alessandro M, di Ioia M, et al. Unraveling the molecular repertoire of tears as a source of biomarkers: Beyond ocular diseases. *Proteomics Clin Appl* 2015;9(1-2):169-186
- 16 Rao YQ, Huang Y, Li J. Impact of collection methods and storage conditions on the recovery of tear proteins. *Int Eye Sci* 2018;18(2):226-230
- 17 McClellan BH, Whitney CR, Newman LP, et al. Immunoglobulins in

- Tears. *Am J Ophthalmol* 1973;76(1):89-101
- 18 陈骊珠, 张墨, 马巍, 等. 蛋白质组学技术在产前诊断生物标志物筛查中的研究进展. *中华全科医学* 2018;16(3):461-464
- 19 Frantzi M, Vlahou A. Ten Years of Proteomics in Bladder Cancer: Progress and Future Directions. *Bladder Cancer* 2017;3(1):1-18
- 20 Yu FJ, Lam TC, Ying-Hon Sze A. Alteration of retinal metabolism and oxidative stress may implicate myopiceyegrowth: Evidence from discovery and targetedproteomicsin an animal model. *J Proteomics* 2020; 221:103684
- 21 Mohanty V, Pinto SM. Digging Deeper for the Eye Proteome in Vitreous Substructures: A High-Resolution Proteome Map of the Normal Human Vitreous Base. *OMICS* 2020;24(6):379-389
- 22 Rossi C, Cicalini I. Multi-Omics Approach for Studying Tears in Treatment-Naïve Glaucoma Patients. *Int J Mol Sci* 2019;20(16):4029
- 23 Chen JL, Hung CT. Proteomic analysis of retinal pigment epithelium cells after exposure to UVA radiation. *BMC Ophthalmol* 2019;19(1):168
- 24 Srivastava A, Creek DJ. Discovery and Validation of Clinical Biomarkers of Cancer: A Review Combining Metabolomics and Proteomics. *Proteomics* 2019;19(10):e1700448
- 25 Svitova TF, Lin MC. Dynamic interfacial properties of human tear-lipid films and their interactions with model-tear proteins *in vitro*. *Adv Colloid Interface Sci* 2016;233:4-24
- 26 De Souza GA, Godoy LMF, Mann M, et al. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol* 2006;7(8):R72
- 27 Perumal N, Funke S, Pfeiffer N, et al. Proteomics analysis of human tears from aqueous-deficient and evaporative dry eye patients. *Sci Rep* 2016;6:29629
- 28 Jung JH, Ji YW, Hwang HS, et al. Proteomic analysis of human lacrimal and tear fluid in dry eye disease. *Sci Rep* 2017;7(1):13363
- 29 Aluru SV, Shweta A, Bhaskar S, et al. Tear Fluid Protein Changes in Dry Eye Syndrome Associated with Rheumatoid Arthritis: A Proteomic Approach. *Ocul Surf* 2017;15(1):112-129
- 30 Uchino Y, Mauris J, Ashley M, et al. Alteration of Galectin-3 in Tears of Patients With Dry Eye Disease. *Am J Ophthalmol* 2015;159(6):1027-1035
- 31 Kim YH, Li ZR, Cui L, et al. Expression of Nod-like Receptors and Clinical Correlations in Patients With Dry Eye Disease. *Am J Ophthalmol* 2019;200:150-160
- 32 Aqrabi LA, Chen XJ, Jensen JL, et al. Severity of clinical dry eye manifestations influences protein expression in tear fluid of patients with primary Sjögren's syndrome. *PLoS One* 2018;13(10):e0205762
- 33 Posa A, Paulsen F, Dietz R, et al. Quantification of surfactant proteins in tears of patients suffering from dry eye disease compared to healthy subjects. *Ann Anat* 2018;216:90-94
- 34 Chan TC, Ye C, Chan KP, et al. Evaluation of point-of-care test for elevated tear matrix metalloproteinase 9 in post-LASIK dry eyes. *Br J Ophthalmol* 2016;100(9):1188-1191
- 35 Niu L, Zhang S, Wu J, et al. Upregulation of NLRP3 Inflammasome in the Tears and Ocular Surface of Dry Eye Patients. *PLoS One* 2015;10(5):e0126277
- 36 Chen H, Chen H, Liang L, et al. Evaluation of Tear Protein Markers in Dry Eye Disease with Different LT- α Expression Levels. *Am J Ophthalmol* 2020;217:198-211
- 37 Koo BS, Lee DY, Ha HS, et al. Comparative Analysis of the Tear Protein Expression in Blepharitis Patients Using Two-Dimensional Electrophoresis. *J Proteome Res* 2005;4(3):719-724
- 38 Song CH, Choi JS, Kim DK, et al. Enhanced Secretory Group II PLA2 Activity in the Tears of Chronic Blepharitis Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2744-2748
- 39 Arantxa A, Tatiana S, Iñaki RA, et al. Changes in Tear Protein Profile in Patients With Conjunctivochalasis. *Cornea* 2011;30(1):42-49
- 40 Li K, Liu X, Chen Z, et al. Quantification of tear proteins and sPLA2-IIa alteration in patients with allergic conjunctivitis. *Mol Vis* 2010;16:2084-2091
- 41 Leonardi A, Palmigiano A, Mazzola EA, et al. Identification of human tear fluid biomarkers in vernal keratoconjunctivitis using iTRAQ quantitative proteomics. *Allergy* 2014;69(2):254-260
- 42 Parthiban N, Sampath NL, JeyaMaheshwari J, et al. Quantitative profiling of tear proteome reveals down regulation of zinc alpha-2 glycoprotein in *Aspergillus flavus* keratitis patients. *Exp Eye Res* 2019; 186:1-15
- 43 Yenihayat F, Altuntaş Ö, Kasap M, et al. Comparative proteome analysis of the tear samples in patients with low-grade keratoconus. *Int Ophthalmol* 2018;38(5):1895-1905
- 44 Pannebaker C, Chandler HL, Nichols JJ. Tear proteomics in keratoconus. *Mol Vis* 2010;16:1949-1957
- 45 Balasubramanian SA, Wasinger VC, Pye DC, et al. Preliminary identification of differentially expressed tear proteins in keratoconus. *Mol Vis* 2013;19:2124-2134
- 46 Shait Mohammed MR, Balamurugan M, Amrathlal RS, et al. Identification of the proteoforms of surface localized Rod A of *Aspergillus flavus* and determination of the mechanism of proteoform generation. *J Proteomics* 2019;193:62-70
- 47 Angeles-Han ST, Yeh S, Patel P, et al. Discovery of tear biomarkers in children with chronic non-infectious anterior uveitis: a pilot study. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2018;8(1):17
- 48 Pieragostino D, Agnifili L, Fasanella V, et al. Shotgun proteomics reveals specific modulated protein patterns in tears of patients with primary open angle glaucoma naïve to therapy. *Mol Bio Syst* 2013;9(6):1108-1116
- 49 Wong TT, Zhou L, Li J, et al. Proteomic profiling of inflammatory signaling molecules in the tears of patients on chronic glaucoma medication. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7385-7391
- 50 江利红, 魏锐利. 甲状腺相关眼病的泪液蛋白质谱分析. 第二军医大学 2014
- 51 江利红, 牟旆, 魏锐利. 甲状腺相关眼病患者泪液中溶菌酶 C 与乳铁蛋白的表达. *中华医学科杂志* 2015;95(10):749-752