

# 蛋白芯片和质谱检测技术在干眼症中的应用

杨延婷<sup>1</sup>, 张丹<sup>1</sup>, 洪珏<sup>1</sup>, 刘婕<sup>1</sup>, 董小庆<sup>2</sup>, 郭潇聪<sup>2</sup>, 马晓芃<sup>1,2</sup>

引用:杨延婷,张丹,洪珏,等.蛋白芯片和质谱检测技术在干眼症中的应用.国际眼科杂志 2020;20(9):1551-1555

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No.81904302);上海市青年科技英才扬帆计划资助(No.19YF1445000);上海市卫生健康委员会项目(No.201940130,201840174)

作者单位:<sup>1</sup>(200030)中国上海市针灸经络研究所;<sup>2</sup>(201203)中国上海市,上海中医药大学

作者简介:杨延婷,女,毕业于上海中医药大学,博士,研究实习员,研究方向:针灸治疗干眼症。

通讯作者:马晓芃,毕业于上海中医药大学,博士,研究员,科室主任,博士研究生导师,研究方向:针灸治疗免疫相关性疾病。pengpengma@163.com

收稿日期:2020-01-06 修回日期:2020-08-03

## 摘要

干眼症是一种眼科常见疾病。随着泪液的非侵入性取样方法的优化,使泪液蛋白分析逐渐成为干眼症疾病诊断和疗效评价的一个最佳选择。已经用于泪液蛋白质组学研究的方法主要包括蛋白芯片技术和质谱检测技术。泪液中的蛋白质及其浓度与不同病理状况之间的关系在干眼症研究中具有重要的价值。在本文中我们回顾了该领域的最新发展、泪液蛋白质组学研究的应用以及当前存在的实际问题,以期对干眼症发生发展的机制研究和分子生物学诊断提供思路。

关键词:干眼症;泪液;蛋白芯片;质谱分析

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.9.17

## Application of protein chip and mass spectrometry in dry eye syndromes

Yan-Ting Yang<sup>1</sup>, Dan Zhang<sup>1</sup>, Jue Hong<sup>1</sup>, Jie Liu<sup>1</sup>, Xiao-Qing Dong<sup>2</sup>, Xiao-Cong Guo<sup>2</sup>, Xiao-Peng Ma<sup>1,2</sup>

**Foundation items:** The Youth Fund of National Natural Science Foundation of China (No.81904302); Shanghai Sailing Project of Young Science and Technology Talents (No.19YF1445000); Scientific Research Project of Shanghai Municipal Health Commission (No.201940130, 201840174)

<sup>1</sup>Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai 200030, China; <sup>2</sup>Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**Correspondence to:** Xiao-Peng Ma. Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Shanghai 200030, China. pengpengma@163.com

Received:2020-01-06 Accepted:2020-08-03

## Abstract

• Dry eye syndrome is one of the most common

ophthalmology diseases. With the improvement of non-invasive tear extraction methods, tear protein analysis becomes a best choice for the diagnosis and evaluation of efficacy of dry eye. Methods that have been used for tear proteomics research include protein chip technology and mass spectrometry. The relationship between the protein in the tear fluid and its concentration and different pathological conditions has important value in the research of dry eye syndromes. This article reviews the latest developments in the field, the application of tear proteomics research and current practical issues, it will provide highlights for the understanding of molecular mechanism of dry eye syndromes and benefits for potential molecular diagnosis of dry eye syndromes in the future.

• **KEYWORDS:** dry eye syndromes; tear; protein chip; mass spectrometry

**Citation:** Yang YT, Zhang D, Hong J, et al. Application of protein chip and mass spectrometry in dry eye syndromes. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(9):1551-1555

## 0 引言

干眼症是目前眼科门诊最常见的一种疾病。其发病率逐年升高并趋于低龄化,流行病学调查显示其发病率为2%~50%,主要以女性患者为主<sup>[1-4]</sup>。国际泪膜和眼表协会干眼疾病工作组第二次会议定义干眼症为“一种多因素性眼表疾病,其主要表现为泪膜不稳定,并伴有多种眼部症状。其病因包括泪膜不稳定、高渗透性、眼表炎症损伤以及神经感觉异常等<sup>[5]</sup>”。干眼症发病机制复杂,临床诊断常以患者症状为基础,但是患者自觉的症状和体征往往缺乏一致性<sup>[6]</sup>。长期以来干眼症诊断缺少“金标准”,并且潜在的发病机制很难被发现<sup>[7-8]</sup>。研究证明只有10%的有症状的患者才能获得临床确诊<sup>[9]</sup>,而漏诊误诊的现象时有发生。此外,由于缺少明确的标志物,新的干眼症药物的开发常常受到阻碍<sup>[10]</sup>。所以寻找有效的干眼症标志物不但可以优化诊断,指导分子靶向治疗并监测治疗反应<sup>[11]</sup>。

泪膜的构成主要为水液、蛋白质、脂类、盐和其他有机分子等。蛋白质主要来源于泪腺,还有部分来源于附属泪腺、睑板腺、Zeis和Moll皮脂腺,以及角膜和结膜细胞<sup>[12]</sup>。研究发现正常人在刺激状态下泪水中总蛋白浓度约为8.1μg/μL,而未受刺激时约为22.7μg/μL<sup>[13]</sup>。这些蛋白质具有保护眼表免受潜在病原体干扰的作用,并且部分蛋白质还参与调节眼表角膜结膜修复的过程<sup>[14-16]</sup>。与正常人比较,干眼症患者眼表泪液中蛋白质表现出明显的变化和差异<sup>[17]</sup>,此外,干眼症患者如果受到干扰因素(吸烟、配戴隐形眼镜等)可导致眼表蛋白的重新分布<sup>[18-19]</sup>,说明泪液蛋白表达的变化与多种全身性或眼部疾病以及环境干扰有关。

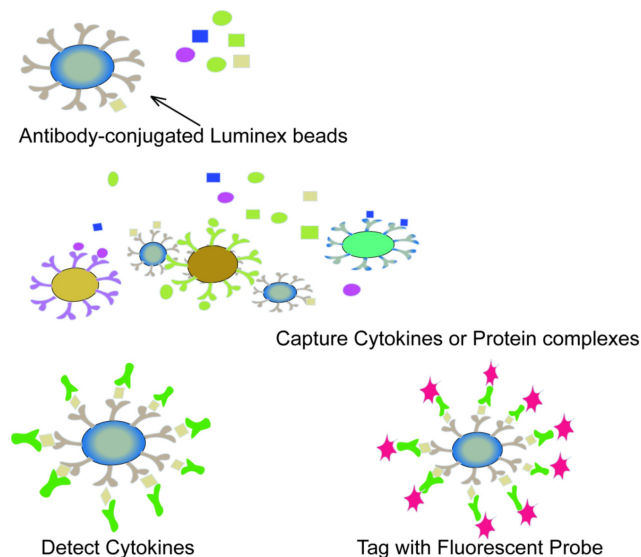


图1 多重珠微阵列示意图。

目前常用的检测泪液蛋白的方法有液相多重珠阵列 (multiplex bead array)、固相芯片膜微阵列 (membrane microarray)、表面增强激光解附离子化飞行时间质谱 (surface-enhanced laserdesorption/ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)、同位素标记相对和绝对定量 (isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ) 等。本文通过系统查阅近年来蛋白组学技术在干眼症中的应用进展, 评估两大类蛋白质检测方法的优缺点, 为进一步提高干眼症的诊断和治疗提供思路。

### 1 蛋白芯片技术在干眼症中的应用

由于眼表组织结构复杂精细, 眼表相关蛋白成分的检测和分析有一定难度。检测时取材困难甚至会损害眼表, 而且获得的组织样本量也较为有限。泪液作为眼表的薄层细胞外液, 可以通过非侵入性方法收集。对泪液样本的相关研究已证实其在发现干眼症相关蛋白质组学生物标记物方面的潜力, 即便是少量泪液也足够用于分析。蛋白芯片和质谱技术因其具有高通量性、敏感性、可重复性、稳定性和自动化的特点, 已在干眼症研究中被用来识别特定的泪液蛋白成分<sup>[20-22]</sup>, 有助于揭示干眼症患者泪液蛋白的差异表达, 并进一步指导临床药物和治疗方法的研究。

**1.1 液相多重珠分析** 液相多重珠分析 (multiplex bead analysis) 技术是一种基于珠子的免疫测定方法, 结合了细胞计数珠的测定和多重 ELISA 法。最早见于 1950 年, 由 Singer 和 Plotz 利用聚合物微珠用于类风湿性关节炎的血清学诊断<sup>[23]</sup>, 经过不断的改进升级后, 这种微珠检测方法已被广泛研究并应用于不同疾病领域<sup>[24]</sup>。目前常用的方法是通过 96 微孔板和双激光, 基于液态流动的分选和检测平台, 将特异性抗体包被在颜色编码的微球珠子上, 并与检测样本 (泪液、血浆、血清、尿液、脑脊髓液等) 一起孵育<sup>[25]</sup>。通过珠子捕获分析物后, 引入生物素化的荧光抗体或者链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白 (Strept-PE) 缀合物以完成测试反应 (图 1)。

ELISA 方法耗时并且成本高, 通常一次只能测量一种分析物, 而微珠技术则可同时分析量化多种分析物。该技术通常用于检测低丰度或难以检测的蛋白质, 包括代谢标记, 磷酸化蛋白质和细胞因子等。Luminex 多重免疫珠测定法是液相多重珠分析技术中最常用方法<sup>[26-27]</sup>。Luminex

技术最大的优势是可在单个反应容器中分析多达 100 种多种细胞因子, 具有高通量、低成本和可检测更小样本体积的特点。

应用 Luminex 技术检测干眼症患者的泪液发现, 与正常组比较蒸发过快型干眼症患者泪液中表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、趋化因子 (Fractalkine CX3CL1、IL-8/CXCL8)、白细胞介素 1 受体拮抗剂 (IL-1Ra)、干扰素诱导蛋白 (IP-10/CXCL10) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的浓度显著增加<sup>[27]</sup>。另外一项基于临床药物治疗效的研究应用这项技术发现利用海藻糖/透明质酸盐滴眼液治疗干眼症患者, 可以减少泪液中 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 IL-8 的表达<sup>[28]</sup>。需要注意大多数 Luminex 技术主要设计用于检测较大的样品体积如 10~25mL, 样本以血浆和血清为主。而对于少量的泪液样本, 研究者只能选择汇总多个泪液样本进行检测, 这样一定程度上增大了误差, 存在异常值而导致数据不准确。所以利用这项技术检测干眼症患者泪液蛋白质的研究并不是很多。

**1.2 膜/抗体微阵列** 膜/抗体微阵列 (membrane microarray/ antibody array) 技术是通过将微量蛋白质固定于载体, 利用高灵敏度读取系统对样品进行分析的技术, 属于固相蛋白芯片的一种<sup>[29-30]</sup>。它能够将各种蛋白质 (例如抗体、抗原、酶等) 固定在蛋白质芯片上, 同时检测实验中样品不同的参数, 且仅需要比其他方法更少的样品。理想的载体表面有渗透滤膜 (如硝酸纤维素膜) 或包被了不同试剂 (如多聚赖氨酸) 的载玻片。然后将样品 (泪液、尿液、间质液、尿液、渗出液等) 直接施加到膜上, 经洗涤、纯化, 再进行确认和生化分析, 利用荧光、化学发光及酶和射线照相检测系统进行灵敏的蛋白质定量分析<sup>[31]</sup>。这种技术检测蛋白质含量可以精确到皮克水平 (pg/mL)。微阵列技术作为一种高通量方法, 可以利用单个样品同时研究多种蛋白质, 非常适用于样本量较少的泪液研究。该技术通常用于分析细胞信号蛋白和细胞因子<sup>[32]</sup>, 与其他蛋白组学技术相比, 具有高通量、样本少、花费低、不需要专业培训及大量的仪器设备等优势<sup>[33]</sup>。

采用此项技术已发现干眼症患者的泪液中基质金属蛋白酶 MMP-3、MMP-10 以及多种生长因子和细胞因子可能在干眼症的发病机制中起重要作用<sup>[34]</sup>。水液不足型干眼症患者与正常对照组比较, Cystatin SN 胱抑素的值升高至 3 倍。研究还发现泪液生成不足合并脂质异常的患者, 患者的蛋白质含量几乎与单纯脂质异常患者相当<sup>[35]</sup>。患有水液不足型合并脂质异常的患者显示大多数测试蛋白质的水平升高<sup>[36]</sup>。

在微阵列技术检测泪液蛋白过程中, 由于蛋白质复合物的存在以及泪液特异性基质效应的潜在影响, 即存在许多对塑料、捕获抗体和 IgG 具有亲和力的因子产生了一系列复杂的基质效应, 可能会导致文献中报道的 ELISA 验证结果的差异<sup>[33, 37]</sup>。由于这种检测手段中的晕染效应、基质效应、图像捕获方法以及捕获和探针抗体之间的串扰可能会极大地影响信噪比并限制获得有意义结果的能力, 所以有必要验证每个阵列的特异性和有效性<sup>[38]</sup>。虽然膜微阵列可提供廉价的筛选工具, 但该技术与分析复杂的蛋白质环境缺乏足够的严谨性<sup>[39]</sup>。而且操作需要消耗大量的时间, 缺少标准化程序, 并且捕获和探针抗体之间可能存在交叉反应<sup>[25]</sup>。所以虽然该方法是一种具有临床潜力的诊断工具, 但需要进一步的标准化研究来验证其稳定性。



## 2 质谱技术在干眼症中的应用

**2.1 SELDI-TOF-MS** 近年来质谱(mass spectrometry, MS)技术已经成为疾病标志物发现的一个新选择,因为它可以用于检测和定量样品中的大多数蛋白质,还可以检测细胞功能和新陈代谢的变化<sup>[40-41]</sup>。质谱技术主要由三部分构成,包括电离、质量分析和检测<sup>[42]</sup>。四种最常见的质量分析仪器是 TOF、四极杆、四极杆/离子阱和傅里叶变换离子回旋共振<sup>[42]</sup>。常用的电离技术包括 ESI、MALDI 和 SELDI<sup>[43]</sup>。其中表面增强激光解附/电离飞行时间质谱 SELDI-TOF-MS 技术由 Hutchens 和 Yip 等在 1993 年首次研究提出<sup>[20]</sup>,并于 1997 年商业化为 ProteinChip 系统。后被广泛用于各类疾病特异性生物标志物的检测和筛选,并取得了一系列的突破性进展<sup>[44]</sup>。由于这项技术灵敏度高,检测速度快,特别适合如泪液等小样本的研究,已经被广泛用于蛋白质组学研究<sup>[45-47]</sup>。

由于检测分析只需少量的样本,因此泪液样本的 MS 分析已经证明它在发现蛋白质组学生物标记物方面具有较大潜力<sup>[48-50]</sup>。SELDI-TOF-MS 对低分子量范围的蛋白质的检测特别敏感,适合从肽和小分子蛋白质来区分干眼和健康眼的区别。通过多变量统计技术和人工神经网络分析数据,并通过串联 MS 纯化和鉴定最重要的生物标志物,可以精确检测到泪液蛋白和肽的复合模式,如脂质运载蛋白和溶菌酶等。

SELDI-TOF-MS 技术的一大优势是可根据选择的不同色谱表面,蛋白质和肽可以通过其生化特性富集或选择性地从表面冲洗掉。这样更容易得到真实的不受干扰的结果。有研究发现干眼症患者的溶菌酶显著降低<sup>[51]</sup>,同样利用反相芯片以及 CM10 阵列检测发现泪液中降低的溶菌酶峰<sup>[52]</sup>。此外 Temel 等<sup>[53]</sup>发现高含水量的隐形眼镜对泪液溶菌酶生理学的干扰最大。这个发现与临床相符,即每天或晚上配戴隐形眼镜都会增加角膜炎症和感染的发生<sup>[54]</sup>。有研究通过 SELDI-TOF-MS 技术发现了 6 个可用于干眼症标记的符合严格标准的蛋白质及多肽<sup>[21]</sup>。与健康受试者相比,发现富含溶菌酶脯氨酸蛋白 4(lysozyme proline-rich protein 4, LPRR4)在蒸发过快型和蒸发过快合并脂质异常患者中减少,并且乳房珠蛋白 B(mammaglobin B)和亲脂素 A(lipophilin A)以及钙粒蛋白(S100A8)在这些患者中增加。通过 2D 电泳和 DIGE 凝胶电泳技术发现 LPRR4 在几种类型的干眼症中显著下调。基于泪液 LPRR4 的差异表达及其与疾病严重程度的相关性,该蛋白被提出作为潜在的干眼症生物标志物<sup>[55]</sup>。这项技术最大的不足是:SELDI-TOF 的多数 MS 光谱检测蛋白的分子量介于 1.5 和 20kDa 之间,而人体中的大多数蛋白质分子量大于 20kDa,因此当 SELDI-TOF-MS 用于泪液分析时,易造成蛋白质信息丢失。

**2.2 iTRAQ** iTRAQ 即为同位素编码的共价标签技术,利用标签特异性地标记蛋白质消化分解后所形成的小分子肽的 N-末端和侧链胺。因此使用 iTRAQ 技术可以标记样品中的每个肽,可以进行更好地蛋白质鉴定和定量。并且 iTRAQ 特别适用于研究多种实验条件,由于它不区分具有某些物理化学特性的肽,因此与其他蛋白质组学方法相比,iTRAQ 可以大大增加鉴定蛋白质的数量。iTRAQ 技术可以直接得到蛋白的定性和相对定量信息,可利用统计学方法快速筛选出各个组别的差异蛋白,且能更好的结合基因组或转录组的数据,有利于后续研究。如果样本数多

于 8 个,还可以在每次上机时设置内参,每个样本先跟内参比较,再相互比较(排除操作、环境和仪器误差),从而实现多组样本间的差异蛋白分析。

应用 iTRAQ 技术在干眼症的研究中发现干眼症蛋白质表达谱发生改变,如  $\alpha$ -烯醇酶( $\alpha$ -enolase)、 $\alpha$ -1-酸糖蛋白 1、S100A8、S100A9、S100A4 和 S100A11 上调,脂质运载蛋白-1、溶菌酶、催乳素诱导蛋白(PIP)和乳铁蛋白的下调<sup>[17, 56]</sup>。有研究者利用 iTRAQ 技术定量分析大鼠泪液中的蛋白,共分析了 269 种蛋白,发生差异表达的蛋白有 118 种<sup>[57]</sup>。另一项关于干眼症动物模型基础研究结果显示,针刺前收集的泪液蛋白质与针刺后蛋白质显著不同。通过 iTRAQ 总共鉴定了 28 种泪蛋白,与针灸相关的是 6 种上调蛋白(泪脂质蛋白、 $\alpha$ -1-抗蛋白酶、富含组氨酸的糖蛋白、血红素结合蛋白、维生素 D 结合蛋白、 $\alpha$ -2-HS-糖蛋白)和 5 种下调蛋白(Annexin A1、血清淀粉样蛋白 A-3 蛋白、解旋酶样转录因子、15kDa 蛋白 A、S100A9)<sup>[58]</sup>。这项研究结果有助于推动传统针灸医学对干眼症治疗的机制研究。此外,还有运用此技术研究两种飞秒 LASIK 手术造成的干眼症泪液中蛋白质的变化,研究发现 Visumax 术后干眼泪液中有更多上调的蛋白质,而 Intralase 术后干眼患者泪液中拥有更多下调的蛋白<sup>[59]</sup>。与 Visumax 手术的眼睛相比,Intralase 操作的眼睛的乳铁转铁蛋白、 $\alpha$ -2 糖蛋白 1 锌、溶菌酶和乳过氧化物酶的含量显著降低。

iTRAQ 技术结合基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS),被认为是生物标志物发现的有效重要方法<sup>[60]</sup>,可以用于鉴定诊断和治疗干眼症和其他炎性眼表面病症的靶蛋白。有研究运用此项技术针对结膜炎患者的泪液进行分析,通过检测了大量肽成功鉴定了 78 种蛋白质。发现结膜炎患者泪液中血清白蛋白、转铁蛋白和血红素结合蛋白的水平比对照泪液水平高 100 倍并且与疾病的严重程度相关。与正常人相比,结膜炎患者血红素结合蛋白、转铁蛋白、乳房珠蛋白 B 等在样品中明显过表达<sup>[56]</sup>。这项技术最大的缺点是检测一些高丰度的蛋白时这些蛋白会大量分布于小孔中,可能会抑制其他蛋白的检出效果。

## 3 总结与展望

基于以上研究发现干眼症患者的泪液蛋白质组谱改变,主要表现为炎症标志物的上调和保护性蛋白水平的降低。不同蛋白质组学研究方法将干眼症患者与正常人的泪液对比,发现 S100A8(钙粒蛋白 A)、 $\alpha$ -烯醇酶、催乳素诱导蛋白(PIP)、脂质运载蛋白-1、S100A9(钙粒蛋白 B)等在干眼患者泪液中升高。这些泪液蛋白主要参与眼表防御,其中溶菌酶、乳铁蛋白、LCN-1 和防御素是先天免疫防御系统的必要组分<sup>[61-62]</sup>。但是这些研究结果也表明,不同形式的干眼症可能具有可用于诊断的不同泪膜蛋白质组生物标志物。使用适当的对照进行生物标志物验证也很重要,以确保潜在的生物标志物用于它们真正代表的病理生理状况。

本综述发现文献中已经有许多基于蛋白芯片和质谱技术的有价值的蛋白质组学研究,但是无法满足临床蛋白质组生物标志物报告的大部分要求。许多潜在的生物标志物已被确定与干眼症的许多临床方面有关,包括诊断、疾病活动和预后。但是缺乏进一步的实验技术的验证,从而可信度不够高。通过研究阅读相关文献发现针对干眼

症泪液蛋白组学研究的文献都比较老旧,几乎没有近3a的相关文章,并且缺乏大样本的研究。其原因可能是由于各类技术并未有显著的更新和更精确的改进,或者由于对于干眼的研究比较局限,并未发挥出其应有的价值。在未来的干眼症生物标志物研究中,最需要解决的问题是使用更大样本量,以及在独立的患者群体中验证已经识别的生物标志物。这样的生物标志物应该成为研究重点,并在未来使用特征良好的患者群体进行更大规模的多中心临床研究,以证明其临床应用价值。

#### 参考文献

1 Hashemi H, Khabazkhoob M, Kheirkhah A, *et al.* Prevalence of dry eye syndrome in an adult population. *Clin Exp Ophthalmol* 2014;42(3):242-248

2 Crane AM, Levitt RC, Felix ER, *et al.* Patients with more severe symptoms of neuropathic ocular pain report more frequent and severe chronic overlapping pain conditions and psychiatric disease. *Br J Ophthalmol* 2017;101(2):227-231

3 Yu J, Asche CV, Fairchild CJ. The economic burden of dry eye disease in the United States: a decision tree analysis. *Cornea* 2011;30(4):379-387

4 Stapleton F, Alves M, Bunya VY, *et al.* TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul Surf* 2017;15(3):334-365

5 Craig JP, Nelson JD, Azar DT, *et al.* TFOS DEWS II Report Executive Summary. *Ocul Surf* 2017;15(4):802-812

6 Soares RPDS, Fernandes APNL, Botarelli FR, *et al.* Clinical indicators of dry eye severity nursing outcome in intensive care unit. *Rev Lat Am Enfermagem* 2019;27:e3201

7 Ong ES, Felix ER, Levitt RC, *et al.* Epidemiology of discordance between symptoms and signs of dry eye. *Br J Ophthalmol* 2018;102(5):674-679

8 Clayton JA. Dry Eye. *N Engl J Med* 2018;378(23):2212-2223

9 Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int* 2015;112(5):71-81

10 Ousler GW, Gomes PJ, Welch D, *et al.* Methodologies for the study of ocular surface disease. *Ocul Surf* 2005;3(3):143-154

11 Peterman S, Thomas L. Protein biomarker discovery. Researchers are bridging the gap between discovery and validation for clinical use. *Mlo Med Lab Obs* 2017;49(6):32-34

12 Hegarty DM, David LL, Aicher SA. Lacrimal Gland Denervation Alters Tear Protein Composition and Impairs Ipsilateral Eye Closures and Corneal Nociception. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59(12):5217-5224

13 Dohlman CH, Friend J, Kalevar V, *et al.* The glycoprotein (mucus) content of tears from normals and dry eye patients. *Exp Eye Res* 1976;22(4):359-365

14 Aqrabi LA, Chen X, 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

15 Fini ME, Jeong S, Gong H, *et al.* Membrane-associated mucins of the ocular surface: New genes, new protein functions and new biological roles in human and mouse. *Prog Retin Eye Res* 2020;75:100777

16 Gibson EJ, Bucknall MP, Golebiowski B, *et al.* Comparative limitations and benefits of liquid chromatography-mass spectrometry techniques for analysis of sex steroids in tears. *Exp Eye Res* 2019;179:168-178

17 Zhou L, Beuerman RW, Chan CM, *et al.* Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *J Proteome Res* 2009;8(11):4889-4905

18 Grus FH, Sabuncuo P, Augustin A, *et al.* Effect of smoking on tear proteins. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002;40(11):889-892

19 Rabiah NI, Scales CW, Fuller GG. The influence of protein deposition on contact lens tear film stability. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019;180:

229-236

20 Elhousseiny AM, Khalil AA, El Sheikh RH, *et al.* New approaches for diagnosis of dry eye disease. *Int J Ophthalmol* 2019;12(10):1618-1628

21 Chen X, Rao J, Zheng Z, *et al.* Integrated Tear Proteome and Metabolome Reveal Panels of Inflammatory-Related Molecules via Key Regulatory Pathways in Dry Eye Syndrome. *J Proteome Res* 2019;18(5):2321-2330

22 Soria J, Duran JA, Etxebarria J, *et al.* Tear proteome and protein network analyses reveal a novel pentamer panel for tear film characterization in dry eye and meibomian gland dysfunction. *J Proteomics* 2013;78:94-112

23 Plotz CM, Singer JM. The latex fixation test I Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Med* 1956;21(6):888-892

24 Pinto IF, Caneira CR, Soares RR, *et al.* The application of microbeads to microfluidic systems for enhanced detection and purification of biomolecules. *Methods* 2017;116:112-124

25 Graham H, Chandler DJ, Dunbar SA. The genesis and evolution of bead-based multiplexing. *Methods* 2019;158:2-11

26 Carreno E, Enriquez-de-Salamanca A, Teson M, *et al.* Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. *Acta Ophthalmol* 2010;88(7):e250-e258

27 Enriquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, *et al.* Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis* 2010;16:862-873

28 Fariselli C, Giannaccare G, Fresina M, *et al.* Trehalose/hyaluronate eyedrop effects on ocular surface inflammatory markers and mucin expression in dry eye patients. *Clin Ophthalmol* 2018;12:1293-1300

29 Neiswinger J, Uzoma I, Cox E, *et al.* Protein Microarrays: Flexible Tools for Scientific Innovation. *Cold Spring Harb Protoc* 2016;2016(10):10

30 Qi H, Wang F, Tao SC. Proteome microarray technology and application: higher, wider, and deeper. *Expert Rev Proteomics* 2019;16(10):815-827

31 Brambilla D, Chiari M, Gori A, *et al.* Towards precision medicine: the role and potential of protein and peptide microarrays. *Analyst* 2019;144(18):5353-5367

32 Ferraccioli G, De Santis M, Peluso G, *et al.* Proteomic approaches to Sjögren's syndrome: a clue to interpret the pathophysiology and organ involvement of the disease. *Autoimmun Rev* 2010;9(9):622-626

33 Sack R, Conradi L, Beaton A, *et al.* Antibody array characterization of inflammatory mediators in allergic and normal tears in the open and closed eye environments. *Exp Eye Res* 2007;85(4):528-538

34 Fu R, Klinngam W, Heur M, *et al.* Tear Proteases and Protease Inhibitors: Potential Biomarkers and Disease Drivers in Ocular Surface Disease. *Eye Contact Lens* 2020;46 Suppl 2(Suppl 2):S70-S83

35 Tong L, Lee SY, Petznick A. Clinical considerations in proinflammatory cytokine profiling of tears from patients with dry eye by means of antibody microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(13):9610-9611

36 Boehm N, Riechardt AI, Wiegand M, *et al.* Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(10):7725-7730

37 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(4):1228-1238

38 Balne PK, Au VB, Tong L, *et al.* Bead Based Multiplex Assay for Analysis of Tear Cytokine Profiles. *J Vis Exp* 2017;(128):55993

39 Copeland S, Siddiqui J, Remick D. Direct comparison of traditional ELISAs and membrane protein arrays for detection and quantification of human cytokines. *J Immunol Methods* 2004;284(1-2):99-106

- 40 Rosenberger G, Koh CC, Guo T, *et al.* A repository of assays to quantify 10, 000 human proteins by SWATH – MS. *Sci Data* 2014; 1:140031
- 41 Picotti P, Aebersold R. Selected reaction monitoring – based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat Methods* 2012;9(6): 555–566
- 42 Vidova V, Spacil Z. A review on mass spectrometry – based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. *Anal Chim Acta* 2017;964:7–23
- 43 You J, Willcox MD, Madigan MC, *et al.* Tear fluid protein biomarkers. *Adv Clin Chem* 2013; 62: 151–196
- 44 Ucal Y, Durer ZA, Atak H, *et al.* Clinical applications of MALDI imaging technologies in cancer and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta Proteom* 2017;1865(7):795–816
- 45 Yigitbasi T, Calibasi – Kocal G, Buyukuslu N, *et al.* An efficient biomarker panel for diagnosis of breast cancer using surface – enhanced laser desorption ionization time – of – flight mass spectrometry. *Biomed Rep* 2018;8(3):269–274
- 46 Ardito F, Giuliani M, Perrone D, *et al.* Expression of salivary biomarkers in patients with oral mucositis: evaluation by SELDI – TOF/MS. *Oral Dis* 2016;22(3): 209–219
- 47 Ardito F, Perrone D, Cocchi R, *et al.* Novel possibilities in the study of the salivary proteomic profile using SELDI – TOF/MS technology. *Oncol Lett* 2016;11(3): 1967–1972
- 48 Nattinen J, Jylha A, Aapola U, *et al.* Topical fluorometholone treatment and desiccating stress change inflammatory protein expression in tears. *Ocul Surf* 2018;16(1): 84–92
- 49 Funke S, Beck S, Lorenz K, *et al.* Analysis of the effects of preservative – free tafluprost on the tear proteome. *Am J Transl Res* 2016;8(10): 4025–4039
- 50 Zhou L, Beuerman RW. Tear analysis in ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res* 2012;31(6): 527–550
- 51 Shigeyasu C, Yamada M, Akune Y. Influence of Ophthalmic Solutions on Tear Components. *Cornea* 2016;35 Suppl1:S71–S77
- 52 Kramann C, Boehm N, Lorenz K, *et al.* Effect of contact lenses on the protein composition in tear film: a ProteinChip study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(2): 233–243
- 53 Temel A, Kazokoglu H, Taga Y. Tear lysozyme levels in contact lens wearers. *Ann Ophthalmol* 1991;23(5): 191–194
- 54 Stapleton F, Naduvilath T, Keay L, *et al.* Risk factors and causative organisms in microbial keratitis in daily disposable contact lens wear. *PLoS One* 2017; 12(8): e0181343
- 55 Aluru SV, Agarwal S, Srinivasan B, *et al.* Lacrimal proline rich 4 (LPRR4) protein in the tear fluid is a potential biomarker of dry eye syndrome. *PLoS One* 2012;7(12): e519
- 56 Srinivasan S, Thangavelu M, Zhang L, *et al.* iTRAQ quantitative proteomics in the analysis of tears in dry eye patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(8): 5052–5059
- 57 Huang F, Xu J, Jin H, *et al.* iTRAQ – Based Quantitative Proteomic Analysis of Tear Fluid in a Rat Penetrating Keratoplasty Model With Acute Corneal Allograft Rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(6): 4117–4124
- 58 Qiu X, Gong L, Sun X, *et al.* Efficacy of acupuncture and identification of tear protein expression changes using iTRAQ quantitative proteomics in rabbits. *Curr Eye Res* 2011;36(10): 886–894
- 59 D’Souza S, Petznick A, Tong L, *et al.* Comparative analysis of two femtosecond LASIK platforms using iTRAQ quantitative proteomics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(6): 3396–3402
- 60 Swiatly A, Horala A, Matysiak J, *et al.* Understanding Ovarian Cancer: iTRAQ – Based Proteomics for Biomarker Discovery. *Int J Mol Sci* 2018;19(8):2240
- 61 Hagan S, Martin E, Enríquez – de – Salamanca A. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J* 2016;7(1):15
- 62 Milner MS, Beckman KA, Luchs JI, *et al.* Dysfunctional tear syndrome: dry eye disease and associated tear film disorders – new strategies for diagnosis and treatment. *Curr Opin Ophthalmol* 2017;27 Suppl 1(Suppl 1):3–47