

# 基因组学在干眼研究中的应用进展

沈乎醒<sup>1</sup>, 高卫萍<sup>1</sup>, 韦庆波<sup>2</sup>, 徐 倩<sup>1</sup>

引用: 沈乎醒, 高卫萍, 韦庆波, 等. 基因组学在干眼研究中的应用进展. 国际眼科杂志 2021;21(5):810-813

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81774419)

作者单位:<sup>1</sup>(210029) 中国江苏省南京市, 南京中医药大学附属医院眼科;<sup>2</sup>(210046) 中国江苏省南京市, 南京中医药大学

作者简介: 沈乎醒, 南京中医药大学在读博士研究生, 研究方向: 中医眼科学、眼表疾病。

通讯作者: 高卫萍, 毕业于南京中医药大学, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主任中医师, 研究方向: 中医眼科学、眼表疾病. gao-weiping@163.com

收稿日期: 2020-05-13 修回日期: 2021-03-24

## 摘要

干眼是伴有眼部不适症状, 严重影响患者工作和生活的一种常见眼表疾病。干眼的病因众多且易复发, 难以有效地治愈。随着聚合酶链式反应 (PCR) 和免疫印迹实验 (Western blot) 等技术在干眼研究领域的运用, 宏基因组学、基因工程动物及基因转染等基因组学事件在干眼研究中得到了进一步的探索。本文旨在总结基因组学在干眼研究中的应用进展, 为进一步揭示干眼发生的危险因素和发病机制, 探索有效治疗干眼的新型药物和疗法提供重要依据。

关键词: 基因组学; 干眼; 发病机制; 治疗

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.5.12

## Application progress of genomics in dry eye research

Hu-Xing Shen<sup>1</sup>, Wei-Ping Gao<sup>1</sup>, Qing-Bo Wei<sup>2</sup>, Qian Xu<sup>1</sup>

Foundation item: National Nature Science Foundation of China (No.81774419)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Wei-Ping Gao. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. gao-weiping@163.com  
Received: 2020-05-13 Accepted: 2021-03-24

## Abstract

• Dry eye is a common ocular surface disease accompanied by ocular discomfort, which severely affects the work and life of patients. There are numerous causes of dry eye, and the disease is easy to recur, which is difficult to cure effectively. With the application of

polymerase chain reaction (PCR) and western blotting in study of dry eye, genomics events such as metagenomics, genetically engineered animals and gene transfection have been further explored in dry eye research. Advances in the application of genomics for dry eye are summarized, in order to provide an important basis for further revealing the risk factors and pathogenesis, and exploring new drugs and therapies for effective treatment of dry eye.

• KEYWORDS: genomics; dry eye; pathogenesis; treatment

Citation: Shen HX, Gao WP, Wei QB, et al. Application progress of genomics in dry eye research. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(5):810-813

## 0 引言

干眼是一种泪膜失去稳定性, 伴有眼表不适症状的常见疾病, 全球发病率约为 5%~50%, 我国发病率为 21%~68.3%<sup>[1]</sup>。干眼的眼表不适症状, 如干涩、异物感、烧灼感、刺痛感等, 治疗困难, 严重影响患者的工作和生活。2017 年国际眼表和泪膜协会第二次会议 (TFOS DEWS II) 强调干眼的主要发病机制是泪膜高渗和不稳定、眼表炎症和损伤以及神经感觉异常, 年龄、性别、用眼方式、滴眼液中的防腐剂和全身性药物、隐形眼镜、眼科手术和非手术治疗都可能导致干眼<sup>[2]</sup>。未来干眼的研究需要进一步的流行病学调查以更好地确定风险因素, 创造出毒性更小的药物, 设计出创伤更小的眼科手术, 基因组学的发展为这些研究打开了新的局面。聚合酶链式反应 (PCR) 和免疫印迹实验 (Western blot)、基因组学等技术的广泛运用, 进一步明确了干眼患者眼表细胞因子和泪液成分的变化。宏基因组学、基因工程动物、基因芯片及基因转染研究的开展, 为深入研究干眼的发病机制, 研发治疗干眼的新药提供了良好的条件。

## 1 宏基因组学在干眼发病率研究中的运用

在已报告的干眼发病率调研中, 超过 40 岁的患者约 38%~68% 有睑板腺功能障碍 (MGD)<sup>[2]</sup>。研究表明, 眼表微生物群与 MGD 导致的干眼密切相关, 但因为泪膜的抗菌特性和泪液的机械冲刷, 只有零星的眼表区域被微生物定殖, 细菌培养技术有限, 无法准确检测<sup>[3]</sup>。宏基因组学的技术可以分析复杂环境群落微生物, 甚至包括不可培养的微生物<sup>[4]</sup>。

Li 等<sup>[5]</sup>提取了 35 例 40 岁以上的干眼患者 (其中 25 例诊断为 MGD) 球结膜多个部位拭子样本中细菌的 DNA, 并用 PCR 技术扩增 RNA, 继而采用 QIIME 软件对细菌 16SrRNA 基因 V3-V4 可变区进行测序, 分析结膜样本中微生物群落 OTU 聚类及多样性。不仅区分了易致干眼的

细菌以及有益于眼表健康的菌落,还发现假单胞菌、巴氏杆菌等才是 MGD 的关键致病菌,而金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌则与 MGD 的发病无明显相关性。MGD 导致的干眼与年龄也有关,研究指出老年小鼠 MGD 与人类 MGD 患者表现的眼表症状相似<sup>[6]</sup>。人与小鼠的基因有 80% 相同,Parfitt 等<sup>[7]</sup>摘取 3 月龄和 2 岁共 10 只小鼠的睑板腺等组织,采用高通量基因测序方法读取组织中提取的 DNA 并制成了宏基因组文库,对不同年龄小鼠的睑板腺等组织进行差异基因表达分析,结果显示有 698 个基因被鉴定为差异表达,确定了包括成纤维细胞生长因子(FGF)和 Wnt 在内的数条信号通路在睑板腺随着年龄发生功能障碍的过程中产生重要作用,为进一步研究 MGD 导致干眼的机制提供了基础。IL-2 受体  $\alpha$  链(CD25)是 IL-2 的结合受体,CD25 基因敲除(CD25KO)小鼠表现出干燥综合征(Sjögren 综合征)的多种特征,包括双眼睑腺炎、眼睑腺炎和角膜结膜炎等<sup>[8]</sup>。Zaheer 等<sup>[9]</sup>比较了饲养在常规和无菌条件下的 CD25KO 小鼠,无菌饲养的 CD25KO 小鼠与常规的相比,结膜杯状细胞密度降低,角膜屏障功能障碍明显,CD4<sup>+</sup>T 细胞浸润增多。将野生型 C57BL/6J 小鼠粪便的微生物移植给无菌 CD25KO 小鼠,可逆转无菌 CD25KO 小鼠的自发性干眼表型。研究表明,体内共生微生物的缺乏可加速泪腺炎症发生、加重其严重程度,并产生了具有更强致病性的 CD4<sup>+</sup>T 细胞,共生微生物或其代谢产物具有保护外分泌腺的免疫调节特性。宏基因组学揭示了微生物在干眼发病原因和发病机制中的重要地位,为精确治疗干眼提供了新的靶点。

## 2 基因芯片在干眼炎症机制研究中的运用

泪液中含有复杂的细胞因子成分,可调节多种细胞功能,也可作为干眼发生的眼表标志物和疾病康复的信号。由于泪液样本微量,ELISA 只能检测样本中复杂的细胞因子中的个别因子的浓度,想要得到泪液中各种细胞因子之间相互作用和整体变化的结果,需要大量检测样本,操作繁琐,费时费力。基因芯片,又称 DNA 微阵列,可以通过生物发光、化学发光检测杂交探针的位置,与大量被测生物细胞或组织标记的核酸序列杂交后,实现基因信息的快速检测<sup>[10]</sup>。基因芯片技术具有高通量、高灵敏度、高特异性的特点,非常适合于同时检测微量泪液样本中的多个细胞因子<sup>[11]</sup>。

Li 等<sup>[12]</sup>采用细胞因子基因芯片检测干眼模型鼠泪液中炎症因子、抗炎因子、生长因子以及其他细胞凋亡因子等,发现 B7-2/Cd86、IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-10、MMP-8、Fas 配体、TNF- $\alpha$  和 TIMP-1 较正常水平升高。基因芯片技术也可用于分析不同疾病导致干眼的泪液成分的特异性变化,为预防继发性干眼提供早期诊断和疗效评估的实验指标。例如曾孝宇<sup>[13]</sup>通过人干眼定量抗体基因芯片(QAH-DED-1)检测糖尿病干眼患者的泪液样本,发现干眼患者泪液中 EGF、IL-1RA 及 MIP-1d 较非干眼糖尿病患者的有明显趋势变化,这些细胞因子或许可以成为糖尿病性干眼早期诊断的标志物。Gad 等<sup>[14]</sup>用多重细胞因子抗体基因芯片测定配戴硅水凝胶角膜软性接触者泪液中 7 种细胞因子 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  的浓度,显示有干眼眼部症状的配戴者促炎细胞因子 IL-17A 水平较高,证实了角膜软性接触镜导致的干

眼眼部症状与眼表炎症有关。Zhang 等<sup>[15]</sup>运用细胞因子基因芯片数据检测鬼针草水提取物对干眼模型鼠泪液中细胞因子 B7-2/Cd86、IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-10、MMP-8、FasL、TNF- $\alpha$  和 TIMP-1 的作用,为进一步选择合适的细胞因子进行 Western blot、检验鬼针草的抗炎作用提供了便利。

## 3 基因转染在干眼新药研究中的运用

在干眼流行病学调查中,根据症状报告得出的疾病总发病率在 14.4%~24.4%,根据体征报告得出的则为 1.3%~10.4%<sup>[2]</sup>,神经病理性疼痛在干眼发病机制中有重要作用,是导致干眼症状和体征分离的主要原因。干眼泪液分泌减少以及炎症均可激活角膜伤害性感受器,导致疼痛不适症状<sup>[16]</sup>。角膜的伤害感受器包括机械神经感受器、多模态-嗅觉传感器以及冷热觉感受器<sup>[17]</sup>。Yang 等<sup>[18]</sup>将不同浓度的角膜冷觉 TRPM8 受体激动剂 cryosim-3(C3,1-二异丙基磷酰基壬烷)溶液用于稳定转染人 TRPM8 cDNA 的中国仓鼠卵巢细胞,测试细胞内钙离子动员曲线,从而筛选有效激动剂浓度,经过鼠感觉神经元钙反应试验后,最终选取合适的 cryosim-3 浓度(2mg/mL)溶液用于干眼患者眼表,证实 cryosim-3 溶液可缓解干眼患者眼表烧灼感等不适症状,为治疗干眼提供了新型的药物和研究方法。

眼部的基因治疗具有局限性,角膜和结膜、上皮和泪膜以及如眨眼或泪膜间隙等生理机制限制了 DNA 有效地渗透到眼球。活性分子与纳米载体的结合,使分子能与特定的眼球结构紧密地相互作用,克服解剖和生理障碍,延长 DNA 在靶组织中的停留时间<sup>[19]</sup>。MUC5AC 是一种具有凝胶形成特性的糖蛋白,Contreras-Ruiz 等<sup>[20]</sup>将含有加载了编码修饰的 MUC5AC 蛋白的纳米质粒的阳离子化明胶覆盖在健康和实验性干眼小鼠的角膜上,成功地在角膜和结膜上皮细胞转染了 MUC5AC 蛋白,修正了干眼小鼠眼表组织 MUC5AC 的表达,使其眼表组织的结构和形态趋于正常,炎症因子水平下降,CD4<sup>+</sup>T 细胞浸润减少,干眼症状明显减轻<sup>[21]</sup>。将基因转染技术和纳米分子材料科学技术相结合,更加有效地为研发治疗干眼新药物提供了新的技术。

## 4 基因测序在干眼手术治疗中的运用

越来越多的患者寻求眼部护理和整容手术,如长期配戴角膜镜和使用含有防腐剂的滴眼液、多次眼表手术等都可能使角膜上皮损伤、角膜缘干细胞(LESCs)功能障碍或缺损,出现干眼。症状严重者可有眼睑痉挛、剧烈疼痛,甚至失明<sup>[22]</sup>。1989/1994 年先后报道了成功完成人自体 LESCs 移植和人同种异体 LESCs 移植重建角膜表面,治疗眼表损伤和 LESCs 缺乏<sup>[23-24]</sup>,研究人员从 1997 年开始进行体外扩增的 LESCs 研究。明确角膜上皮的表型是成功获得体外扩增 LESCs 的关键因素<sup>[25]</sup>。由于缺乏 LESCs 的特异性生物标志物和原位上皮细胞亚群的精确分子表征,这一生物工程领域的进展受到了实质性的阻碍。Bath<sup>[26]</sup>利用激光捕获显微解剖和 RNA 测序相结合的方法,对人类角膜上皮细胞的原位亚群进行分析,进行全局转录组分析,明确了原位角膜上皮亚群的综合分子表征,获得了适合 LESCs 的选择性体外扩增的有效低氧浓度和培养基,为通过培养的角膜上皮移植治疗角膜缘上皮干细胞缺乏提

供了大量的数据。间充质干细胞(MSCs)被认为是值得进一步探索的可以限制组织破坏的修复细胞<sup>[27]</sup>。Lee等<sup>[28]</sup>将小鼠骨髓衍生间充质干细胞(mMSCs;  $1 \times 10^5$  cells/20  $\mu$ L; BSS)注射到干眼模型鼠泪腺中,与注入PBS缓冲液的泪腺组织进行对比,结果显示泪腺注射mMSCs后组织中CD4<sup>+</sup>细胞浸润减少,IL-2和IFN- $\gamma$ 表达水平下降;睑结膜的杯状细胞的数量明显增加、黏液的分泌量也有所增加;萎缩的泪腺结构在局部灌注mMSCs后也有部分恢复,表明MSCs可以通过抑制炎症,促进组织修复来保护眼表。干细胞的培养和移植依赖在干眼领域的研究还有可以探索的广泛内容,运用好基因组学的技术,可以促进干细胞在干眼领域运用的长足进步。

### 5 基因工程动物在干眼动物造模研究中的运用

基因工程动物的发展为复杂性状疾病的研究提供了理想的动物模型,可以在活体内分析单个候选基因的作用,将复杂的问题拆解分析,分别对单一因素进行分析,为深入研究发病机制和基因治疗创造了条件<sup>[29]</sup>。泪腺功能障碍使泪液分泌减少,引发干燥、导致炎症反应是干眼重要的发病机制之一。

低氧诱导因子(HIF-1 $\alpha$ )介导的细胞凋亡诱导配体(TRAIL)可调控炎症因子和免疫细胞表达<sup>[30]</sup>。Ji等<sup>[31]</sup>将HIF-1 $\alpha$ 条件性基因敲除的C57BL/6小鼠和野生型C57BL/6小鼠共同放置设定的干燥环境并皮下注射氢溴酸东莨菪碱(5mg/mL)诱导干眼,结果显示HIF-1 $\alpha$ 基因敲除的小鼠泪腺腺泡细胞中CD45<sup>+</sup>细胞的浸润显著增强,TRAIL基因表达水平较野生型明显降低,炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-17A蛋白表达水平显著升高,诱导加速了腺泡细胞死亡。该研究为泪腺腺泡细胞衍生的TRAIL在炎症性损伤中的调节功能提供了新的见解。泪膜的稳定性对干眼眼表的健康也很重要,泪液的脂质层可维持泪膜稳定性,磷脂转移蛋白(PLTP)是人类泪液脂质层的正常成分。为了研究PLTP在泪膜稳定性中能否起到功能作用,Setälä等<sup>[32]</sup>采用野生型C57BL/6小鼠和PLTP敲除的C57BL/6小鼠,均进行干眼诱导。PLTP敲除小鼠的角膜上皮损伤、上皮羧基荧光素通透性以及闭塞素裂解较野生型小鼠明显加重。提示泪液中PLTP的存在对维持健康和功能正常的眼表是必不可少的。基因工程动物可以将干眼复杂和混合的发病机制拆解开,深入研究发病机制,为进一步研究新型的治疗药物和手段提供方法。

### 6 结语

新一代基因组学技术使临床医生和研究人员能够从大规模研究群体中收集基因组数据量,结合新的信息学方法将多种数据与基因组数据进行集成后,更好地理解疾病机制和药物反应<sup>[33]</sup>。“精准医学”这一概念被提出后,临床上对基因组学的高通量测序技术需求越来越多。目前基因组学在干眼研究的主要侧重于细胞因子基因的转录、翻译和蛋白质-蛋白质相互作用的变化,肠道和眼表微环境菌落的多样性宏基因组测序、炎症及凋亡细胞因子基因芯片检测,这些先进技术的运用为临床医生提供了较多较完善的干眼发病原因和发病机制的研究结论,利于指导临床医生制定更精准的治疗方案。此外,基因组学多重技术对治疗干眼新药和新治疗技术研发等提供科学支撑,目前已有跨学科的研究,基因组学结合材料学、网络药理学等,不

仅为眼表疾病,更为难治性、遗传性眼底视网膜病变带来治疗的希望。在未来的研究中,更加侧重于基因组学对干眼发病率、组织的修复和重建的作用,为寻找更加快速有效的诊断和治疗方案以及疾病的预后提供新的思路。

### 参考文献

- 1 Stapleton F, Alves M, Bunya VY, et al. TFOS DEWS II epidemiology report. *Ocul Surf* 2017;15(3):334-365
- 2 Nelson JD, Craig JP, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II Introduction. *Ocul Surf* 2017;15(3):269-275
- 3 Venugopal R, Satpathy G, Sangwan S, et al. Conjunctival microbial flora in ocular stevens-Johnson syndrome sequelae patients at a tertiary eye care center. *Cornea* 2016;35(8):1117-1121
- 4 Gallon P, Parekh M, Ferrari S, et al. Metagenomics in ophthalmology: Hypothesis or real prospective? *Biotechnol Rep (Amst)* 2019;23:e00355
- 5 Li ZH, Gong YF, Chen SZ, et al. Comparative portrayal of ocular surface microbe with and without dry eye. *J Microbiol* 2019;57(11):1025-1032
- 6 Parfitt GJ, Xie YL, Geyfman M, et al. Absence of ductal hyperkeratinization in mouse age-related meibomian gland dysfunction (ARMGD). *Aging (Albany NY)* 2013;5(11):825-834
- 7 Parfitt GJ, Brown DJ, Jester JV. Transcriptome analysis of aging mouse meibomian glands. *Mol Vis* 2016;22:518-527
- 8 Sharma R, Zheng L, Guo X, et al. Novel animal models for Sjögren's syndrome: expression and transfer of salivary gland dysfunction from regulatory T cell-deficient mice. *J Autoimmun* 2006;27(4):289-296
- 9 Zaheer M, Wang CJ, Bian F, et al. Protective role of commensal bacteria in Sjögren Syndrome. *J Autoimmun* 2018;93:45-56
- 10 Roda A, Pasini P, Mirasoli M, et al. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends Biotechnol* 2004;22(6):295-303
- 11 李凯军, 吴开力. 液相芯片技术及其在泪液细胞因子检测中的应用. *眼科学报* 2010;25(1):4-10
- 12 Li K, Zhang CW, Yang ZC, et al. Evaluation of a novel dry eye model induced by oral administration of finasteride. *Mol Med Rep* 2017;16(6):8763-8770
- 13 曾孝宇. 糖尿病相关干眼患者临床指标及泪液细胞因子的变化. 天津医科大学 2018
- 14 Gad A, Vingrys AJ, Wong CY, et al. Tear film inflammatory cytokine upregulation in contact lens discomfort. *Ocul Surf* 2019;17(1):89-97
- 15 Zhang C, Li K, Yang Z, et al. The Effect of the Aqueous Extract of Bidens Pilosa L. on Androgen Deficiency Dry Eye in Rats. *Cell Physiol Biochem* 2016;39(1):266-277
- 16 Galor A, Moein HR, Lee C, et al. Neuropathic pain and dry eye. *Ocul Surf* 2018;16(1):31-44
- 17 McKay TB, Seyed-Razavi Y, Ghezzi CE, et al. Corneal pain and experimental model development. *Prog Retin Eye Res* 2019;71:88-113
- 18 Yang JM, Li F, Liu Q, et al. A novel TRPM8 agonist relieves dry eye discomfort. *BMC Ophthalmol* 2017;17(1):101
- 19 de la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, et al. Chitosan-based nanostructures; a delivery platform for ocular therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62(1):100-117
- 20 Contreras-Ruiz L, Zorzi GK, Hileeto D, et al. A nanomedicine to treat ocular surface inflammation; performance on an experimental dry eye murine model. *Gene Ther* 2013;20(5):467-477
- 21 魏瑞华. 腺相关病毒介导IL-10转基因治疗对兔自身免疫泪腺炎干眼模型免疫抑制作用. 天津医科大学 2011
- 22 Gomes JAP, Azar DT, Baudouin C, et al. TFOS DEWS II iatrogenic report. *Ocul Surf* 2017;15(3):511-538

23 Frucht-Pery J, Siganos CS, Solomon A, *et al.* Limbal cell autograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Albrecht Von Graefes Arch Fur Klinische Und Exp Ophthalmol* 1998;236(8):582-587

24 Tsai RJ, Tseng SC. Human allograftlimbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 1994;13(5):389-400

25 Utheim TP, Aass Utheim Ø, Salvanos P, *et al.* Concise review: altered versus unaltered amniotic membrane as a substrate for limbal epithelial cells. *Stem Cells Transl Med* 2018;7(5):415-427

26 Bath C. Human corneal epithelial subpopulations: oxygen dependent *ex vivo* expansion and transcriptional profiling. *Acta Ophthalmol* 2013;91 (Thesis 4):1-34

27 Prockop DJ, Kota DJ, Bazhanov N, *et al.* Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). *J Cell Mol Med* 2010;14(9):2190-2199

28 Lee MJ, Ko AY, Ko JH, *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental

dry eye. *Mol Ther* 2015;23(1):139-146

29 顾为望, 刘光泽, 王万山. 基因工程动物与现代比较医学研究. *实验动物与比较医学* 2006;1:4-9

30 Beyer K, Baukloh AK, Stoyanova A, *et al.* Interactions of tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand (TRAIL) with the immune system: implications for inflammation and cancer. *Cancers (Basel)* 2019;11(8):E1161

31 Ji YW, Lee JH, Choi EY, *et al.* HIF1 $\alpha$ -mediated TRAIL expression regulates lacrimal gland inflammation in dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2020;61(1):3

32 Setälä NL, Metso J, Jauhiainen M, *et al.* Dry eye symptoms are increased in mice deficient in phospholipid transfer protein (PLTP). *Am J Pathol* 2011;178(5):2058-2065

33 Lu YF, Goldstein DB, Angrist M, *et al.* Personalized medicine and human genetic diversity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4 (9):a008581