·文献综述·

蛋白组学在干眼研究中的应用进展

杨 颖,张嘉之,姬慧杰,高卫萍

引用:杨颖,张嘉之,姬慧杰,等. 蛋白组学在干眼研究中的应用进展. 国际眼科杂志, 2024,24(4):585-588.

基金项目:江苏省中医院院级科研基金(No.Y22056)
作者单位:(210029)中国江苏省南京市,南京中医药大学附属医院眼科
作者简介:杨颖,在读博士研究生,副主任医师,研究方向:干眼的中西医治疗。
通讯作者:高卫萍,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: 2023-07-20 修回日期: 2024-02-23

摘要
干眼的病理机制复杂,涉及免疫、炎症等多种通路,需要整体研究方案从全局进行把控。各类组学技术可以从整体和全局的高度阐明生物体复杂的生理病理状态,提供更加全面的生物信息。质谱技术可以灵敏检测出泪液样本中的蛋白含量变化,为干眼的蛋白组学研究提供了便捷条件。目前蛋白组学在干眼类型鉴别、严重程度分级、疗效评价等方面都显示出应用价值,并且与代谢组学、微生物组学联用可以更加全面地阐释干眼发病机制。未来蛋白组学有望为干眼的精准诊疗提供更加有力的支持,并在靶向治疗中发挥优势。
关键词:系统生物学;蛋白组学;干眼;生物标记物
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.4.17

Application progress of proteomics in dry eye research

Yang Ying, Zhang Jiazhi, Ji Huijie, Gao Weiping

Foundation item: Hospital - level Scientific Research Fund of Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine (No.Y22056)
Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Gao Weiping. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. gao-weiping@163.com
Received:2023-07-20 Accepted:2024-02-23

Abstract
• The complex pathological mechanism of dry eye involves multiple pathways, such as immunity and inflammation, and requires an integral research program to control the whole picture. Various histological techniques can elucidate the complex physio-pathological state of organisms from a holistic and global perspective, thus providing more comprehensive biological information. Mass spectrometry can sensitively detect the changes of protein content in tear samples, providing convenience for proteomics research of dry eye. At present, proteomics has demonstrated its application in the identification of dry eye types, severity grading, and therapeutic effect evaluation. In addition, proteomics combined with metabolomics and microbiomics can more comprehensively explain the pathogenesis of dry eye. In the future, proteomics is expected to provide more powerful support for the precise diagnosis and treatment of dry eye, taking an advantage in targeted therapy.
• KEYWORDS: system biology; proteomics; dry eye; biomarkers

Citation: Yang Y, Zhang JZ, Ji HJ, et al. Application progress of proteomics in dry eye research. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2024,24(4):585-588.

0 引言

最新定义认为干眼是一种多因素的眼表疾病,其特征是泪膜失去稳态导致一系列眼表症状,泪膜不稳定、高渗、眼表炎症和损伤以及神经感觉异常都参与其中[1]。《国际泪膜和眼表协会干眼工作组发布第二版系列共识》认为干眼的核心机制是水分蒸发或损失引起眼表组织高渗损伤,导致上皮细胞和杯状细胞的损失,从而进一步影响泪膜稳态加剧高渗状态,形成恶性循环[2]。干眼的分子机制十分复杂,涉及免疫、炎症等多种通路,如何从整体的角度深入分析,避免盲目实验,为靶向治疗提供依据,也是亟待解决的问题。系统生物学可以从整体和全局的高度阐明生物体复杂的生理病理状态,主要包括:基因组学、微生物组学、蛋白质组学、代谢组学等。各类组学技术在干眼诊疗机制的研究受到广泛应用和关注。国内学者已总结了基因组学、微生物组学、代谢组学在干眼中的应用[3-5]。蛋白质组学从生物样本中分离和鉴定蛋白质,可以客观准确地反映各样本中的含量,为不同样本蛋白质水平的差异筛选提供了有效方法[6]。非靶向蛋白质组学可以发现新的蛋白变化,揭示新的生物标志物和疾病治疗靶点[7]。虽然已有学者从检测技术的角度总结了干眼蛋白组学的应用,但缺乏大样本的研究支持[8]。本文将从干眼的发病机制入手,结合干眼的最新分类[9],综述蛋白组学在干眼研究中的最新应用进展。

1 检测标本和常用技术

蛋白质浓度为 8-10 mg/mL 的泪液因为无创采集且较易获得[10],已成为干眼蛋白组学研究的常用标本。常用采集方法包括 Schirmer 试纸、玻璃毛细管、外科海绵

等[11]。泪液蛋白根据含量不同可以分为三大类[7]:高含量组(mg/mL)蛋白由泪腺、睑板腺、杯状细胞和副泪腺分泌,包括溶菌酶(lysozyme, LYZ)、乳铁蛋白(lactoferrin, LTF)、血清白蛋白(albumin, ALB)、分泌型免疫球蛋白 A(secretory immunoglobulin A, sIgA)、载脂蛋白-1(lipocalin1, LCN1)、亲脂性蛋白、催泪蛋白(lacritin)和富含脯氨酸的蛋白质(proline-rich proteins, PRR);中含量组(mg/mL 到 ng/mL)蛋白主要由细胞信号分子分泌;低含量组蛋白主要是细胞因子和生长因子蛋白。有限的泪液体积和大范围波动的蛋白含量,对蛋白组学检测的灵敏度提出了很高要求。值得注意的是,因为肽含量偏低和蛋白质的不稳定性,小分子的分泌蛋白如白细胞介素、细胞因子、趋化因子等较难通过质谱等方式鉴定。因此,蛋白芯片技术[12]或酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)方法对这些免疫因子检测更有效[13]。

目前蛋白质组学的主流技术主要包括基于凝胶和色谱的分离技术和基于质谱的分析技术[14]。干眼的蛋白组学技术包括蛋白质分离、变性裂解,基于凝胶或缓冲液进一步处理成小片段,最后进行质谱分析。在处理过程中可以采用标记和非标记技术两种。常用的标记技术包括传统使用的基于二维凝胶电泳的定量蛋白质组学分析[15],以及基于质谱的同位素标记蛋白组学分析,比如使用同位素标记对肽段进行相对和绝对定量修饰的 iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantification)技术[16]。标记定量蛋白组学敏感、准确性高,但对样品及标记的要求高、试剂昂贵,无法应用于大规模蛋白分析。非标记定量蛋白组学是指比较的样本无需标记[17],通过对比特定的肽段或蛋白在两个不同样本间质谱信号的强弱,就可得到样本间蛋白表达量的变化,可重复进行样本实验,适用于大规模蛋白分析,但是准确性不如标记定量技术。在干眼的蛋白组学研究中,这两种方法都有广泛应用[7]。

2 参与干眼发病机制的关键蛋白和潜在蛋白标记物

2.1 热休克蛋白家族相关通路 在氧化应激、高渗应激和干燥条件下,热休克蛋白(heat shock protein, HSP)-B 上调。它激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路,进而激活应激活化蛋白激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)和转录因子 NF-κB 通路,并增加基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、白介素(interleukin, IL)-1β、IL-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α。这些炎性细胞因子刺激先天免疫系统产生抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APC)。

2.2 谷胱甘肽通路 氧化应激、高渗应激抑制谷胱甘肽代谢,而谷胱甘肽 S 转移酶 pi1 蛋白可以重新激活谷胱甘肽代谢。

2.3 过氧化物酶体增殖物激活受体途径 一方面,过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors, PPAR)可激活与糖脂代谢、碳水化合物相关的对干眼产生保护作用的重要基因。但在氧化和干燥应激下,NF-kB 通路被激活,并阻断 PPAR 信号传导,炎症基因表达并产生 IL-17。在 PPAR 途径中参与的蛋白有载脂蛋白 A1/A2 和磷脂转移蛋白。

2.4 免疫相关途径 S100A8 和 S100A9 都属于 S100 钙结合蛋白家族,通过 T 样受体激活免疫体统,改变眼相关淋巴系统的免疫耐受,并可通过激活 MARK 通路介导炎症反应[18]。在 S100A8 和 S100A9 增加的情况下,APC 转化为成熟 APC(mature APC, mAPC),激活 Th1 细胞释放 IL-17、IFN-γ、TNF-α。这些细胞因子刺激适应性免疫系统,缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1,HIF-1)/2α 和 HIF-1β 基因被转录为血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)-A、VEGF-C 和其他血管生成蛋白。

既往关于干眼的蛋白组学研究中,2 项以上的研究证实 31 种蛋白在干眼泪液中存在差异表达,这些蛋白和免疫、细胞修复、抗氧化、抗菌、眼表炎性等生物过程相关,12 种蛋白得到了独立验证并有望成为潜在的生物标记物[7]。12 种独立标记物中表达上调的有钙结合蛋白 S100A6/S100A8/S100A9、膜联蛋白 A1(annexin A1, ANXA1)、α-1-酸性糖蛋白 1(alpha-1-acid glycoprotein 1, ORM1)。钙结合蛋白是由吞噬细胞产生的炎症介质,在屏障功能和先天性免疫中发挥重要作用。炎症、氧化应激、眨眼减少或其他环境因素可能是 S100A8 和 S100A9 表达增加的原因[18]。ANXA1 是一种促炎介质,可调节渗透压。ORM1 是一种急性反应期蛋白,在机体出现炎症、感染时增加。下调的蛋白比如 LYZ、LTF、ALB、sIgA、LCN1 等则是正常泪液中的主要蛋白成分。换言之,泪液正常蛋白组分的下调可能提示干眼的发生。

3 蛋白标记物对干眼类型的鉴别作用

3.1 脂质异常型干眼 国内学者发现 S100A8 和 S100A9 的表达与睑板腺功能障碍(meibomian gland dysfunction, MGD)干眼的严重程度相关[19],并且这两种蛋白的增加可能与 MGD 腺管上皮高度角化有关。然而 Soria 等[20]认为 S100A8 和 S100A9 并不能用来鉴别 MGD 干眼,甚至在 MGD 干眼呈现下降的趋势,可能与 MGD 蛋白分泌整体下降有关,同时提出由硫氧还蛋白、免疫球蛋白、磷脂酶 A2 蛋白、纤溶酶原激活物抑制剂、分泌性白细胞蛋白酶抑制因子和乳过氧化物酶蛋白组成的六个标记物组可以鉴别 MGD 干眼。

3.2 水液缺乏型干眼 Boehm 等[21]报告了 6 种候选生物标志物蛋白,可用于鉴别水液缺乏型干眼,其中分泌蛋白疏脂蛋白 A、C 在水液缺乏和脂质异常型干眼中呈现相反的变化趋势,但在水液缺乏和混合性干眼中都存在 PRR 下调和 S100A8 上调[21-22]。研究者认为泪液体积的改变和泪膜成分的变化,是造成水液缺乏型干眼蛋白组学差异的主要原因,而在脂质异常型干眼中,蛋白变化相对较小,仅仅是脂质层的破坏,对于泪液蛋白表达的影响较小。

另有学者收集了泪腺导管开口处的泪液[23-24],发现其蛋白成分和眼表收集的泪液蛋白有明显差异(1 448 种 *vs* 1 165 种),只有 48% 的蛋白成分是相同的[23]。在泪腺分泌不足和水液缺乏型干眼中,LYZ、LTF、LCN1 均表达下调。而泪腺分泌不足时上调的差异蛋白多和细胞凋亡、免疫防御炎性过程相关。

3.3 黏蛋白异常型干眼 黏蛋白是一种高度糖基化的高

分子亲水蛋白家族[25]。泪膜的黏蛋白(mucins)主要包括分泌型黏蛋白(例如 MUC5AC)和跨膜黏蛋白(例如 MUC16)[26],参与维持泪膜稳定。分泌型黏蛋白和泪膜的水液成分共同形成凝胶状物质覆盖眼表,既可清除细胞碎片,又可发挥抗菌抗炎的屏障作用。跨膜黏蛋白则在眼表形成细胞支架发挥抗黏附作用。在黏蛋白异常型干眼中,MUC 家族蛋白表达显著下降。国外学者等通过琼脂糖凝胶电泳和化学发光检测,使用多种抗体在泪液中检测到 MUC1、MUC4、MUC16 和 MUC5AC,这些蛋白可作为黏蛋白异常型干眼的生物标志物[27]。但是由于黏蛋白的糖基化水平很高和特异性抗体的形成受到限制,因此黏蛋白的定性和定量检测仍有一定困难,也缺乏大样本的研究[25]。

除了对类型进行鉴别,有些蛋白还具有临床症状相关性。一项研究利用抗体芯片筛选出几种干眼差异表达蛋白 S100A6、MMP9 和端粒结合蛋白 cystatin S(CST4),并且与干眼程度相关,体现在 OSDI 干眼问卷评分、Schirmer 试验、TBUT 和荧光染色等方面[28]。CST4 由泪腺和睑板腺分泌,与干眼严重程度呈显著负相关,有望成为干眼严重程度分级的泪液稳态标志物。

4 蛋白组学的治疗评价作用

在一项比较 0.05%环孢素(cyclosporin A,CSA)和地夸磷醇四钠(diquafosol tetrasodium, DQS)治疗后的蛋白组学显示,两种治疗方式都提高了先天免疫和获得性免疫及细胞解毒反应[29]。内肽酶活性、蛋白质代谢和伤口愈合的调节在 CSA 治疗中增加,在 DQS 治疗中减少,而参与应激调节的蛋白质反应、组织稳态和防御反应则在 CSA 治疗中下调,在 DQS 治疗中上调。和基线相比,DQS 直接促进蛋白质的分泌。

针灸作为在绝经后妇女干眼的补充治疗有很好的疗效[30]。联合治疗组的症状评分改善优于单纯人工泪液组,蛋白组学结果显示联合治疗组分泌蛋白增加,细胞质蛋白丰度降低,免疫相关蛋白质上调,增殖相关蛋白下调。

5 蛋白组学和代谢组学的联合使用

国内学者使用了一种非标记的纳米级液体色谱与四极飞行时间串联质谱光谱法进行干眼蛋白质组学和代谢组学综合分析[31]。作者发现,泪液中表达变化的 190 种蛋白质中有 120 多种与炎症反应相关。关键的炎症相关蛋白包括锌 α2 糖蛋白、LYZ、LTF 和 CST4。而 34 种失调代谢产物具有抗炎和保护作用。代谢结果的网络分析提示增强了先天免疫、补体和凝血反应的激活,以及糖酵解/糖异生、氨基酸生物合成、酪氨酸代谢和谷胱甘肽代谢。代谢变化与蛋白质组学变化相呼应,表明代谢改变需要增加大量蛋白质的合成。

6 蛋白组学和微生物组学的联合使用

在近期的一项研究中[32],国外学者使用全基因组鸟枪测序法检测了 40 个干眼眼表样本的微生物组学,并用纳米液相色谱-串联质谱法分析了泪液蛋白组学,探讨了两者之间的关联。比如干眼患者中的黏蛋白-16 和不动杆菌的表达呈负相关,眼表的细菌成分可能会影响泪液中黏蛋白的释放。同时作者筛选出和眼表细菌相关且表达丰度最高的 3 种泪液蛋白:伴侣蛋白、抗砷性蛋白和解旋酶细菌蛋白。伴侣蛋白是在应激状态下通过细菌感染表达的蛋白,抗砷性蛋白与细菌的氧化应激反应有关,解旋酶细菌蛋白则与细菌的 DNA 复制有关。研究进一步证明在干眼的炎症反应中,眼表微生物和泪液蛋白成分也存在相互作用和影响,也提示了眼表微环境对干眼发病的关键作用。

7 结语

综上,蛋白组学的先进技术提供了对泪液小样本进行蛋白分析的可能,也为干眼的蛋白组学研究奠定了基础。干眼的蛋白组学差异主要反映炎症、细胞凋亡、免疫防御等机制,而其中高频出现的蛋白比如钙结合蛋白可以作为进一步研究的靶向生物标记物。不同类型的干眼体现出不同蛋白标志物的变化,比如在水液缺乏型干眼中,正常泪液蛋白含量下降,与干眼发病机制有一定的吻合。研究中的差异结果可能与不同研究人种有关,而且无论哪种干眼都可能引发炎症反应,导致炎症相关蛋白增加,可能与干眼的不同发病阶段也有关联。目前,蛋白组学可应用于干眼生物标记物的鉴定、不同干眼类型的鉴别、干眼治疗的疗效评价,为我们理解干眼的发病机制提供了更加实际深入的循证依据。在各种组学的联合应用和相互佐证下,干眼研究“如虎添翼”,蛋白组学有望在干眼的靶向治疗中发挥更大的潜能。

参考文献

[1] Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II definition and classification report. Ocul Surf, 2017,15(3):276-283.

[2] Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, et al. TFOS DEWS II pathophysiology report. Ocul Surf, 2017,15(3):438-510.

[3] 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.

[4] 金拓, 高卫萍. 代谢组学在干眼研究中的应用进展. 眼科新进展, 2022,42(4):329-332.

[5] 郑攀攀, 梁庆丰. 眼表微生态在干眼发生发展中作用机制研究进展. 国际眼科纵览, 2017,41(5):332-336.

[6] Huo P, Zhu Y, Liang C, et al. Non-invasive Amino Acid Profiling of Embryo Culture Medium Using HPLC Correlates With Embryo Implantation Potential in Women Undergoing *in vitro* Fertilization. Front Physiol, 2020,11:405.

[7] Jackson CJ, Gundersen KG, Tong L, et al. Dry eye disease and proteomics. Ocul Surf, 2022,24:119-128.

[8] 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.

[9] 亚洲干眼协会中国分会, 海峡两岸医药卫生交流协会眼科学专业委员会眼表与泪液病学组, 中国医师协会眼科医师分会眼表与干眼学组. 中国干眼专家共识:定义和分类(2020 年). 中华眼科杂志, 2020,56(6):418-422.

[10] 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.

[11] Pieczyński J, Szulc U, Harazna J, et al. Tear fluid collection methods: review of current techniques. Eur J Ophthalmol, 2021,31(5):2245-2251.

[12] 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.

[13] Kannan R, Das S, Shetty R, et al. Tear proteomics in dry eye disease. Indian J Ophthalmol, 2023,71(4):1203-1214.

[14] Rozanova S, Barkovits K, Nikolov M, et al. Quantitative mass spectrometry-based proteomics: an overview. Methods Mol Biol, 2021, 2228:85-116.

[15] Robotti E, Calù E, Marengo E. Two - Dimensional Gel Electrophoresis Image Analysis. Methods Mol Biol 2021;2361:3-13.

[16] Zong RR, Zhu FF, Han W, et al. Tear dynamics testing and quantitative proteomics analysis in patients with chronic renal failure. J Proteomics, 2021,248:104351.

[17] Soria J, Acera A, Merayo-LLoves J, et al. Tear proteome analysis in ocular surface diseases using label-free LC-MS/MS and multiplexed-microarray biomarker validation. Sci Rep, 2017,7(1):17478.

[18] Wang SW, Song R, Wang ZY, et al. S100A8/A9 in inflammation. Front Immunol, 2018,9:1298.

[19] Tong L, Zhou L,Beuerman RW, et al. Association of tear proteins with Meibomian gland disease and dry eye symptoms. Br J Ophthalmol, 2011,95(6):848-852.

[20] Soria J, Durán JA, Etxebarria J, et al. Tear proteome and protein network analyses reveal a novel pentamarker panel for tear film characterization in dry eye and meibomian gland dysfunction. J Proteomics, 2013,78:94-112.

[21] Boehm N, Funke S, Wiegand M, et al. Alterations in the tear proteome of dry eye patients—a matter of the clinical phenotype. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013,54(3):2385-2392.

[22] 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.

[23] 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.

[24] Ji YW, Mittal SK, Hwang HS, et al. Lacrimal gland-derived IL-22 regulates IL-17-mediated ocular mucosal inflammation. Mucosal Immunol, 2017,10(5):1202-1210.

[25] 洪晶. 密切关注眼表黏蛋白研究及其在干眼诊疗中的意义. 中华实验眼科杂志, 2020,38(11):910-915.

[26] Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. Exp Eye Res, 2020,197:108115.

[27] Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gipson I. Assay of mucins in human tear fluid. Exp Eye Res, 2007,84(5):939-950.

[28] Benitez-Del-Castillo JM,Soria J, Acera A, et al. Quantification of a panel for dry-eye protein biomarkers in tears: a comparative pilot study using standard ELISA and customized microarrays. Mol Vis, 2021,27:243-261.

[29] Ji YW, Kim HM, Ryu SY, et al. Changes in human tear proteome following topical treatment of dry eye disease: cyclosporine A versus diquafosol tetrasodium. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60(15):5035-5044.

[30] Liu QY, Liu JL, Ren CD, et al. Proteomic analysis of tears following acupuncture treatment for menopausal dry eye disease by two-dimensional nano-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Int J Nanomedicine, 2017,12:1663-1671.

[31] Chen XL, 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.

[32] Schlegel I, DeGoüyon Matignon de Pontourade CMF, Lincke JB, et al. The human ocular surface microbiome and its associations with the tear proteome in dry eye disease. Int J Mol Sci, 2023,24(18):14091.