

泪液的相关研究与进展

阎 慧 综述 赵少贞 审校

The research progress in tear fluid analysis

Yan Hui, Zhao Shaozhen. Tianjin Medical University Eye Center, Tianjin 300070, China

Abstract Tear is a complex fluid mainly secreted by lacrimal gland. Tear continuously covers the ocular surface to form tear film by blinking. Currently, a large variety of investigations on the special tear film component and function have been developed, including tear lipids, proteins, mucins and mucins mRNA. The tear fluid, meibomian gland secretion and ocular surface cells collected by impression cytology, brush cytology, conjunctive biopsy can be used for molecular biology assessment of tear complexity using electrophoresis, chromatography associated with mass spectrometry, PCR techniques etc. . However, some limits of these methods should be acknowledged, such as technique problem in tear collection, especially in the eye with dry eye. In additional, most measurement way and result still lack the consistent standard. Generally, the development in tear fluid research offers a help for eye doctor to better understand the relationship of tear film with dry eye disease, meanwhile, a good basis for the diagnosis and therapy of dry eye.

Key words tear fluid; dry eye; lipid; tear protein; mucins

摘要 泪液是主要由泪腺分泌的一种水样液体,通过瞬目运动覆盖在眼表面形成泪膜。当前就泪膜的特殊结构和功能等方面,已开展了大量研究,将收集到的泪液,睑板腺分泌物,印迹细胞学、刷检细胞学、结膜活组织检查收集到的眼表细胞,应用电泳、色谱分析联合质谱分析及聚合酶链式反应(PCR)等分子生物学技术,分析泪膜脂质、蛋白、黏蛋白分子及其 mRNA 是较常用的方法。泪液成分分析技术的进步为临床医师了解泪膜,诊断及治疗干眼症提供了有力的依据。就泪液成分分析的基本方法和研究现状进行综述。

关键词 泪液;干眼症;脂质;泪液蛋白;黏蛋白

分类号 R 777.2 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)07-0633-04

泪液的化学成分复杂,除水和电解质外,还有含氮物质、糖类、寡核苷酸、甾醇、有机酸、维生素、酶类和脂类,其中水分占 98%~99%^[1]。为了维持眼表各种细胞的正常功能,泪液的 pH 值、渗透压和各种离子的质和量必须保持在一个相对较窄的范围内,确保眼表的健康状态和屈光系统的透明。现将泪液成分分析的基本方法和研究现状综述如下。

1 泪液标本的采集

一般认为泪液成分的测定结果受标本采集方法的影响很大,由于泪液量少,尤其是干眼患者要采集到足够的样本很困难,以往常用机械法或化学刺激结膜法增加泪液分泌,但这些方法势必造成收集到的泪液成分改变,所以目前多用非刺激法采集标本,常用方法有

以下几种:(1)毛细管采集法,从内眦点 2 滴生理盐水,在患者数次眨眼后用毛细管在外眦收集泪液;(2)滤片纸吸附法,如 Schirmer 试验,临床上多用,但对结膜的刺激较大,会造成泪液中血清衍生蛋白的增加;(3)细管直接采集法,对结膜刺激小,但对于干眼患者很难收集到足够的泪液用于分析;(4)多孔聚酯杆、聚亚安酯小海绵收集泪液,其吸水性较高,患者的耐受性较好^[2]。

2 泪膜脂质的分析

2.1 泪膜脂质的成分

脂质层位于泪膜最表面,主要由睑板腺分泌的脂质构成,主要化学成分是胆固醇脂、蜡脂、甘油三酯、游离脂肪酸、二脂、碳水化合物、游离胆固醇和极性脂质,可为眼表提供平滑的屈光面并防止泪液的蒸发。泪液脂质层较薄,约 $0.1 \mu\text{m}^{[1]}$,由亲水的极性脂质和其上

作者单位:300070 天津医科大学眼科中心

通讯作者:赵少贞 (Email: zhaoszl1997@sina.com)

疏水的非极性脂质组成,两者以疏水键相连,共同构成泪膜的脂质层。非极性脂质拥有较大的表面张力,使泪膜在眨眼后迅速恢复平滑状态;极性脂质与其下的水液相交连,形成一层水化的黏液胶^[3-5]。

2.2 泪膜脂质的分析方法

脂质的收集法:用棉棒轻挤压受试者的眼睑,在睑板腺开口处用细玻璃管收集脂质,或直接从泪液中分离;先将收集到的脂质溶于氯仿等有机溶剂,室温下氮气中蒸干, -80℃液氮中储存;脂质的分离检测可采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)或气相色谱法联合质谱分析,也可以直接通过³¹P磁共振法、薄层色谱法等分析睑板腺脂质成分^[6]。研究发现睑板腺分泌物中的磷脂含量很低,不到总脂质的0.01%^[7],另外还检测到脂肪酸的存在,猜测可能与泪液中的细胞信号传递有关^[8]。

2.3 泪膜脂质在干眼中的表现

睑板腺功能障碍(meibomian gland dysfunction, MGD)患者的泪液中甘油三酯和胆固醇的含量降低^[7],除非极性脂质减少外,McCulley等^[4]研究发现,慢性睑缘炎患者的干眼状况与极性脂质的特定改变直接相关,单不饱和脂肪酸尤其是十八烯酸明显减少。应用固化金属离子亲和层析色谱仪提纯浓缩极性脂质,通过基质辅助的激光解析电离飞行时间质谱分析发现,磷脂在正常眼和干眼间有很大差别,而几种鞘磷脂只在干眼中存在。慢性睑板腺炎而无睑板腺开口阻塞的患者,极性脂质尤其是磷脂酰乙醇胺和鞘磷脂减少^[8]。

3 泪液蛋白的分析

3.1 泪液蛋白的作用

de Souza等^[9]应用蛋白质组学技术发现,人泪液中含有491种不同的蛋白质,其主要的生物学功能:(1)杀灭细菌、病毒和真菌等微生物,发挥特异和非特异性免疫功能;(2)提供脂质转运载体;(3)削弱因紫外线照射引起的细胞损伤,抑制丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶的活性,减少细胞自溶;(4)营养角膜、结膜上皮细胞,加速眼表愈合;(5)调整角膜结膜上皮细胞的运动、增生和分化等功能。目前认为,蛋白质主要由主泪腺、副泪腺及眼表上皮细胞分泌,还有来自结膜血管中血清蛋白的溢出^[1,9],另一方面,睑板腺也分泌多种微量蛋白^[10]。

3.2 泪液蛋白的分析方法

当前泪液蛋白质的分析技术有多种,凝胶电泳

(gel electrophoresis, GE)和HPLC是分离纯化蛋白质常用的2种,单一GE分离复杂蛋白质的能力有限,之后出现的一维/二维十二烷基磺酸铵-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate gel polyacrylamide electrophoresis, SDS-PAGE)、毛细管电泳等弥补了这种缺陷,十二烷基磺酸铵带较多负电荷,覆盖在蛋白质颗粒表面,使蛋白质分子间的电荷差异消失,可定量分析蛋白质;2D-SDS-PAGE技术,即第一向根据蛋白质所带电荷量的不同,进行等电点聚焦电泳分离,第二向根据分子量的不同,再进行分离,这样就将复杂蛋白质混合物在二维平面上分离。电泳结束后,应用蛋白质显色剂显色,再进行酶解,质谱分析。这种方法可重复性好、敏感性高,但耗时、费力、所需样本量较大^[10]。

80年代后期出现的电喷雾离子化-质谱技术和激光解析电离质谱技术分别利用高电场、激光将蛋白质分子离子化,根据不同质荷比得出质谱图,经计算机软件处理,快速、高效地鉴定蛋白质。近年随着质谱技术的发展,泪液蛋白质组学研究成为新的热点,一个重要目标是寻求与疾病发生发展相关的蛋白质标记物,以期快速、准确地诊断疾病^[11]。

3.2.1 泪腺分泌蛋白 人泪液蛋白质大部分来自泪腺,其中20%~40%为溶菌酶,由溶酶体产生,属长链、大分子量糖蛋白,耐热,耐低温^[12],溶菌酶通过水解细菌细胞壁的 β 1-4键,杀死细菌,最近研究发现溶菌酶还具有吸收、侵入脂质的作用,从而降低眼表张力^[13]。摘除泪腺后,溶菌酶从泪液中消失;用免疫法检测病毒性结膜炎患者的泪液,发现溶菌酶显著减少,且与疾病严重程度成正比^[14]。另外,溶菌酶水平随着年龄的增长而降低,Sjögren综合征患者溶菌酶合成减少^[15]。乳铁蛋白是一种铁离子结合蛋白,阻止细菌利用铁,从而抑制细菌生长,主要在泪腺细胞浆合成^[16];应用酶联免疫吸附试验分析泪液中乳铁蛋白的浓度,发现各种类型的干眼症,泪腺乳铁蛋白均有不同程度的减少^[17]。泪液 lipocalin (TL) 蛋白又名泪前白蛋白,主要由泪腺及 Von Ebner 腺体合成分泌,为脂结合蛋白。采用免疫扩散法研究角膜接触镜配戴者的 TL 水平,发现其泪液 TL 水平明显高于正常对照组,此外,在不能耐受角膜接触镜的患者泪液中 TL 的浓度也高于能耐受者;通过 HPLC 法分析发现, MGD 患者泪液中 TL 的含量明显降低,且与泪膜破裂时间呈正相关,与角膜荧光染色分数呈负相关^[18]。

3.2.2 血清蛋白 泪液清蛋白即从眼表血管血浆中溢出的白蛋白,在正常人泪液中含量极微,但当结膜受到刺激时大量增加;免疫球蛋白 IgA、IgG、IgE 等执行

着泪液的非特异性免疫功能;泪液中免疫球蛋白以 IgA 为主,这些免疫蛋白可有效地抵御外来病毒或抗原,同时 IgA 能协调溶菌酶使细菌裂解^[19]。

3.2.3 睑板腺分泌蛋白 Tsai 等^[10]研究发现睑板腺分泌超过 90 种蛋白质,应用 HPLC/MS/MS 技术检测睑板腺分泌物发现 α_2 巨球蛋白受体、IgA α 链、干扰素调节因子-3、lacrutin 前体、转铁蛋白前体、lipocaline 1、酪氨酸激酶等。

3.2.4 其他泪液蛋白 Aquaporins (AQPs) 是一类由上皮细胞及内皮细胞合成的同源性水转运蛋白。眼部至少表达 5 种, AQP4、AQP5 在泪腺及颌下腺的含量丰富^[20]。Ohashi 等^[17]用酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 发现, Sjögren 综合征患者泪液中 AQP5 浓度明显升高, 推测其原因为 Sjögren 综合征患者的泪腺细胞由于受到淋巴细胞的破坏, AQP5 大量渗入泪液中所致; 同时由于淋巴细胞的渗入导致泪腺细胞功能缺陷, 虽然 AQP5 合成能力未受影响, 但不能有效地将其从细胞浆转运到细胞膜上, 导致泪腺局部细胞膜的水快速转运通道障碍, 反射性泪液分泌减少。

另一方面, 一些炎症因子在干眼症患者的泪液中显著增加, Stern 等^[21]报道 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TGF- β 1、TNF- α 在干眼症患者结膜上皮中的含量明显高于对照组。Sjögren 综合征患者泪液中 IL-6 显著升高, 而 TNF 的变化不大^[22]。

4 黏蛋白的分析

4.1 泪液黏蛋白的基本结构

黏蛋白是泪膜中黏液胶的结构和骨架分子。应用分子克隆技术和糖蛋白基因编码测序技术分析黏蛋白发现, 黏蛋白是富含氨基酸串联重复序列的大分子糖蛋白, 单糖、双糖与寡糖通过氧-糖肽键连接于黏蛋白骨架中的丝氨酸和苏氨酸残基上。当前运用分子生物学技术已检测出 19 种黏蛋白基因^[23]。根据黏蛋白功能域的不同, 分为分泌性的和膜结合性的黏蛋白, 前者又分为可溶性的和凝胶状的黏蛋白。凝胶状黏蛋白是以浓缩形式储存于分泌颗粒中的大分子量分子, 当受到适当刺激时主动分泌; 可溶性黏蛋白分子量比凝胶状的小但分泌方式相同; 膜结合型的黏蛋白分子量最小^[24]。

4.2 黏蛋白的检查方法

4.2.1 ELISA 和免疫印迹法分析 ELISA 和免疫印迹法常利用黏蛋白特异氨基酸序列与抗体结合进行的抗原抗体反应来检测泪液中所含的黏蛋白。ELISA 法

常规在检测前用糖基酶去糖基使抗体更易接近黏蛋白的抗原中心, 减少因糖链阻碍抗体结合造成检测误差。Argüeso 等^[25]应用 ELISA 法测定发现 MUC5AC 黏蛋白在干眼患者的泪液中明显减少。Spurr-Michaud 等^[26]应用免疫印迹技术检测人泪液发现 MUC1、MUC4、MUC16、MUC5AC、MUC2 黏蛋白的存在, 但尚未在泪液中检测到 MUC7 黏蛋白。

4.2.2 印迹细胞学、刷检细胞学分析黏蛋白 mRNA 和蛋白质 印迹细胞学技术是一种简单、快速、便宜、无痛、无损伤的非侵入性结膜上皮细胞采集法。在结膜囊内点表面麻醉剂后用清洁印迹膜 (如硝酸纤维素膜、多聚磺醚滤纸) 黏取结膜上皮细胞后浸入 0.05% 多聚甲醛溶液中, 为避免收集到的细胞裂解, 需将其储存于 4 °C 恒温环境中, 于 PBS 缓冲液中离心后, 进行免疫组织化学和分子生物学研究^[27]。印迹细胞学可收集包括杯状细胞在内的结膜上皮的顶端细胞和顶端下细胞, 用于分析黏蛋白的 mRNA 和蛋白表达^[1, 28]。Corrales 等^[29]用结膜印迹细胞学联合 RT-PCR 检测到 MUC1、MUC2、MUC4、MUC5AC 及 MUC7, 并首次检测出 MUC13、MUC15、MUC16 和 MUC17 存在于人结膜上皮细胞中。然而, 究竟这些 mRNA 能否被转录尚未得知, 到目前为止, 利用现有的分子生物学技术还未在泪液中直接检测到 MUC7 黏蛋白的存在。Berry 等^[30]应用免疫荧光法, 直接在角膜结膜上皮细胞中检测到 MUC4 黏蛋白。利用流式细胞学技术在印迹细胞学收集到的结膜杯状细胞中发现了 MUC5AC 黏蛋白^[31]。

刷检细胞学技术也可用于眼表细胞的采集, 其基本方法是表面麻醉后以细胞刷轻压于结膜表面, 擦取上皮细胞后立即置于 Hank 缓冲液中, 4 °C, 8 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液, 将细胞沉淀物悬浮于 1 mL isogen 溶液中, 置于 -20 °C 冰箱中保存^[32]; 1 次刷检细胞学检查可采集到至少 100 000 个上皮细胞, 包括结膜基底细胞和表层细胞, 联合流式细胞学技术进行分子生物学分析。

4.2.3 原位免疫杂交技术、免疫印迹法分析结膜活组织黏蛋白 mRNA 和蛋白质 结膜活组织的采集比印迹法和刷式细胞学对眼表的损害大, 但这种方法可直接检测结膜上皮各层细胞的蛋白质表达和黏蛋白 mRNA 合成的具体部位; 原位免疫杂交技术最早应用于 20 世纪 60 年代末期, 具有高度的敏感性和特异性, 基本测定法是将切取的结膜组织用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡封闭, 利用特异性抗体探针与黏蛋白基因肽链串联重复序列进行原位杂交, 即可检测出黏蛋白基因是否在待测组织中存在^[27]。Inatomi 等^[33]采用 RT-

PCR、RNA 印迹及原位杂交法证实培养的人角膜上皮各层均有 MUC1 mRNA 表达,免疫印迹和免疫组织化学分析发现,MUC1 蛋白主要在角膜上皮细胞膜的顶端分布,在结膜组织则主要分布在基底区域。

4.3 干眼患者黏蛋白的改变

研究认为,MUC5AC 的改变与干眼的发生密切相关。Argüeso 等^[25]运用实时 RT-PCR 技术分析发现,Sjögren 综合征患者结膜上皮 MUC5AC mRNA 的表达显著减少,而 MUC1 mRNA 和 MUC4 mRNA 的表达无明显变化;用酶联免疫吸附试验分析,同样发现其泪液中 MUC5AC 蛋白的表达水平明显降低,同时,流式细胞学检查干眼患者结膜组织发现,MUC5AC 的合成细胞-结膜杯状细胞也减少;另一方面,Mantelli 等^[34]报道,新生儿泪液中 MUC5AC 黏蛋白水平明显高于成年人,可能与其泪膜破裂时间长、瞬目次数少有关。有研究认为跨膜黏蛋白的丧失或改变可单独或合并 MUC5 分泌型黏蛋白的减少是角膜干燥斑形成的主要原因^[35]。

当前,随着泪液分离及检测技术的进步,可以更准确地测定健康人的泪液成分及可能与干眼症等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。

参考文献

- 刘祖国.眼表疾病学[M].北京:人民卫生出版社,2003:131-154
- López-Cisternas J, Castillo-Díaz J, Traipe-Castro L, et al. Use of polyurethane minisponges to collect human tear fluid[J]. *Cornea*, 2006, 25: 312-318
- Craig JP, Tomlinson A. Importance of the lipid layer in human tear film stability and evaporation[J]. *Optom Vis Sci*, 1997, 74: 8-13
- McCulley JP, Shine W. A compositional based model for the tear film lipid layer[J]. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1997, 95: 79-88
- Greiner JV, Glonek T, Korb DR, et al. Phospholipids in meibomian gland secretion[J]. *Ophthalmic Res*, 1996, 28: 44-49
- Ham BM, Cole RB, Jacob JT. Identification and comparison of the polar phospholipids in normal and dry eye rabbit tears by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47: 3330-3338
- Butovich IA, Uchiyama E, McCulley JP. Lipids of human meibum: mass-spectrometric analysis and structural elucidation[J]. *J Lipid Res*, 2007, 48: 2220-2235
- Yamada M, Mochizuki H, Kawai M, et al. Decreased tear lipocalin concentration in patients with meibomian gland dysfunction[J]. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89: 803-805
- de Souza GA, Godoy LM, Mann M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors[J]. *Genome Biol*, 2006, 7: R72
- Tsai PS, Evans JE, Green KM, et al. Proteomic analysis of human meibomian gland secretions[J]. *Br J Ophthalmol*, 2006, 90: 372-377
- Jacob JT, Ham B. Compositional profiling and biomarker identification of the tear film[J]. *Ocul Surf*, 2008, 6(4): 175-185
- Klaeger AJ, Whitcher JP, Daniels TE. Tear lysozyme activity in frozen Schirmer strips and salivary gland biopsy as parameters of lacrimal gland function[J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 1999, 7: 3-6
- Mudgil P, Torres M, Millar TJ. Adsorption of lysozyme to phospholipid and meibomian lipid monolayer films[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2006, 48: 128-137
- Gupta AK, Sarin GS, Lamba PA, et al. Immunoassay of tear lysozyme in acute adenovirus conjunctivitis[J]. *Br J Ophthalmol*, 1986, 70: 439-441
- Avisar R, Menache R, Shaked P, et al. Lysozyme content of tears in patients with Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis[J]. *Am J Ophthalmol*, 1979, 87: 148-151
- 刘景祥,李燕伟,张冰洁.泪液乳铁蛋白与干眼症相关性研究[J]. *眼科研究*, 2005, 23: 620
- Ohashi Y, Ishida R, Kojima T. Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome[J]. *Am J Ophthalmol*, 2003, 136: 291-299
- 邱翎,孔丽萍,杨建荣,等. TL 对脂质泪液不足型干眼症影响的初步研究[J]. *临床眼科杂志*, 2007, 2: 3-6
- Mircheff AK, Wang Y, Jean Mde S, et al. Mucosal immunity and self-tolerance in the ocular surface system[J]. *Ocul Surf*, 2005, 3: 182-192
- Ishida N, Hirai SI, Mita S. Immunolocalization of aquaporin homologs in mouse lacrimal glands[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238: 891-895
- Stern ME, Pflugfelder SC. Inflammation in dry eye[J]. *Ocul Surf*, 2004, 2: 124-131
- Yoon KC, Jeong IY, Park YG, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome[J]. *Cornea*, 2007, 26: 431-437
- Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78: 379-388
- Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin gene[J]. *Ann Rev Physiol*, 1995, 57: 607-634
- Argüeso P, Balaran M, Spurr-Michaud S, et al. Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjögren syndrome[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43: 1004-1011
- Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gipson I. Assay of mucins in human tear fluid[J]. *Exp Eye Res*, 2007, 84: 939-950
- Brignole F, Ott AC, Warnet JM, et al. Flow cytometry in conjunctival impression cytology: a new tool for exploring ocular surface pathologies[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78: 473-481
- Berry M, Brayshaw D, McMaster TJ. Dynamic molecular resolution imaging of precocular fluid impressions[J]. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88: 1460-1466
- Corrales RM, Galarreta DJ, Herreras JM, et al. Normal human conjunctival epithelium expresses MUC13, MUC15, MUC16 and MUC17 mucin genes[J]. *Arch Soc Esp Ophthalmol*, 2003, 78: 375-381
- Berry M, Ellingham RB, Corfield AP. Human precocular mucins reflect changes in surface physiology[J]. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88: 377-383
- Argüeso P, Gipson IK. Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function[J]. *Exp Eye Res*, 2001, 73: 281-289
- Fujihara T, Takeuchi T, Saito K, et al. Evaluation of human conjunctival epithelium by a combination of brush cytology and flow cytometry: an approach to the quantitative technique[J]. *Diagn Cytopathol*, 1997, 17: 456-460
- Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, et al. Human corneal and conjunctival epithelia express MUC1 mucin[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36: 1818-1827
- Mantelli F, Tiberi E, Micera A, et al. MUC5AC overexpression in tear film of neonates[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2007, 245: 1377-1381
- Danjo Y, Watanabe H, Tisdale AS. Alteration of mucin in human conjunctival epithelia in dry eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39: 2602-2609

(收稿:2008-09-10 修回:2009-05-24)

(本文编辑:王莉红)