

引文格式: 崔红, 李正日, 孙丽霞, 任宁, 李英俊. 炎症因子在糖尿病性干眼患者中的表达变化及其意义[J]. 眼科新进展, 2018, 38(7): 651-655. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0153

炎症因子在糖尿病性干眼患者中的表达变化及其意义[△]

崔红 李正日 孙丽霞 任宁 李英俊

Expression of inflammatory factors in type 2 diabetic patients with dry eyes and its significance

CUI Hong, LI Zheng-Ri, SUN Li-Xia, REN Ning, LI Ying-Jun

【Abstract】 Objective To investigate the expression and significance of inflammatory factors in type 2 diabetic patients with dry eyes. **Methods** Totally 102 diabetic patients (102 eyes) who met the diagnostic criteria for dry eye were collected as diabetic dry eye group and 84 normal individuals (84 eyes) as control group. All subjects were inquired about dry eye syndrome and received the examination including tear break-up time (BUT), Schirmer I test (SIT) and corneal fluorescein staining (FLS). Conjunctival epithelial cells of patients in both groups were examined by imprint cytological test and immunohistochemical staining while double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of concentration of inflammatory factors in tears.

Results Immunohistochemical staining results represented that the positive expression rate of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in conjunctival epithelial cells of diabetic dry eye group were higher than those of the control group, and the difference was statistically significant ($P = 0.008, 0.016$) and the Spearman correlation analysis showed that there was a significant positive correlation between the two groups ($r = 0.654, P = 0.005$). The levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), chemokine C-C ligand 3 (CCL3), CCL4, CCL5 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the tears of diabetic patients were significantly higher than those of the control group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** IL-1 β , CCL3, TNF- α , TGF- β_1 are highly expressed in the epithelial cells and tears of diabetic patients with dry eye and meanwhile play key roles in the clinical diagnosis.

【Key words】 inflammatory factors; diabetes mellitus; dry eye

【摘要】 目的 研究炎症因子在糖尿病性干眼患者中的表达变化及意义。**方法** 选择符合干眼病诊断标准的糖尿病患者(糖尿病干眼组 102 例 102 眼)及正常对照者(正常对照组 84 例 84 眼)。所有受检者均接受干眼症状询问及相关检查如:泪膜破裂时间(tear break-up time, BUT), 泪液分泌试验(schirmer I test, SIT)及角膜荧光素染色(fluorescein staining, FLS)评分。将两组结膜上皮细胞进行印迹细胞学检查和免疫组织化学染色。采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测所收集的泪液中炎症因子的浓度。结果 免疫组织化学染色结果显示:糖尿病组患者的结膜上皮细胞中转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)与转录因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)的阳性表达率均明显高于正常对照组,差异均具有统计学意义($P = 0.008, 0.016$), Spearman 相关性分析结果显示,两者之间显著正相关($r = 0.654, P = 0.005$)。ELISA 法检测结果显示,糖尿病组患者的泪液中白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、趋化因子3(chemokine C-C ligand 3, CCL3)、CCL4、CCL5 及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的浓度均明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。结论 IL-1 β 、CCL3、TNF- α 、TGF- β_1 等都在糖尿病性干眼患者的结膜上皮细胞及泪液中高表达,并有临床指导意义。

【关键词】 炎症因子; 糖尿病; 干眼

【中图分类号】 R777

糖尿病可引起多种眼部并发症如角结膜炎、视网膜病变及代谢性白内障等。近年来,除了糖尿病引起的视网膜病变因可致盲而备受关注外,糖尿病引起的干眼问题也受到广大学者的关注^[1]。在干眼

的发病机制中,炎症因子作为导致干眼发生的关键因素,通过影响泪膜的稳定性和功能性以及升高泪液渗透压等因素诱发眼表和结膜上皮细胞的损害^[2]。研究表明^[3]糖尿病患者是干眼的易患人群,

糖尿病性干眼的发生是以泪液质和量的失调,鳞状上皮化生及杯状细胞减少为特征,随着眼表亲水性和泪膜稳定性的不断降低、炎症因子不断聚集,导致眼表稳定性被不断破坏,进而诱发糖尿病性干眼的发生^[4]。本研究通过探讨白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)等炎症相关因子在糖尿病性干眼患者结膜上皮细胞及泪液中的表达变化,旨在了解糖尿病性干眼患者眼表改变的影响因素,以便更好地治疗与干预糖尿病相关性眼表疾病。

1 资料与方法

1.1 研究对象 随机选择2015年3月至2016年3月在我院就诊并已确诊8 a以上的2型糖尿病性干眼患者102例(102眼)为糖尿病组(均符合WHO糖尿病诊断标准),其中男52眼,女50眼,年龄42~73(52.03 \pm 8.26)岁。另选择正常人84名(84眼)为正常对照组,其中男43眼,女41眼,年龄40~69(55.12 \pm 6.31)岁。糖尿病组与正常对照组的性别、年龄的构成比差异均无统计学意义($P=0.078$ 、 0.066)。本研究遵守《赫尔辛基宣言》,并经过医院伦理委员会评审通过,已获得患者知情同意。

1.2 纳入与排除标准 正常对照组纳入标准:无眼部刺激症状,无眼部用药史,基础泪液分泌试验(schirmer I test, SIT) >10 mm/5 min,泪膜破裂时间(tear break-up time, BUT) >10 s,眼表无荧光素染色。排除标准包括:角膜接触镜配戴者,眼部外伤史或手术史,药物过敏史,以及任何眼部或全身疾病。糖尿病性干眼患者纳入标准:(1)主观症状:眼干涩感,异物感,烧灼感,眼红,分泌物多,眼睑沉重感,视疲劳,畏光,流泪,痒感,眼痛,视力波动;前6项症状中需有1项或多项经常出现或持续存在。(2)泪膜不稳定:BUT ≤ 5 s(++)或 ≤ 10 s(+).(3)泪液分泌减少:泪液分泌量 ≤ 5 mm/5 min(++)或 ≤ 10 mm/5 min(+).(4)眼表面损害:角膜荧光素染色(fluoresce in staining, FLS)评分 ≥ 1 分。依据以上所述,主观症状阳性加眼部检查(BUT、SIT、FLS)1项强阳性(++)或2项阳性(+)诊断为干眼;糖尿病组人群为除干眼、糖尿病外无其他眼病及影响泪液分泌的其他系统疾病者。

1.3 方法

1.3.1 BUT检测 将荧光素钠滤纸条触及受检者下睑结膜囊内,嘱其眨眼后自然平视,采用裂隙灯蓝色激发光下观察受检者瞬目后睁眼至角膜出现第一个黑斑(破裂点)的时间为BUT。

1.3.2 FLS检测 FLS阳性反映角膜上皮缺损(不连续)。泪膜破裂试验后观察角膜上皮着色情况,将角膜平分为四个象限:0分:无染色;1分:散在点状

染色或小于5个着色点;3分:高密度点状染色或片状染色或出现块状或丝状物;2分介于两者之间。共计0~12分。

1.3.3 SIT检测 将5 mm \times 35 mm泪液试纸首端折弯5 mm,置于下眼睑中外部1/3交界处,闭眼5 min后取出试纸,自折弯处测量试纸被泪液浸湿的长度。

1.3.4 干眼问卷调查 所有受检者均在同一医师指导下完成干眼问卷调查(ocular surface disease index, OSDI)的填写,该问卷由国际干眼工作小组(International Dry Eye Workshop)制定,包括12个问题,共0~100分:0~12分为无症状;13~32分为轻度~中度症状;33~100分为严重症状。

1.3.5 结膜印迹细胞学检查 将6 mm硝酸纤维素膜圆形纸片,高压灭菌后干燥待用。让受检者平卧位,眼表麻醉结膜囊,以无菌镊夹住滤纸一角,轻压颞侧球结膜5 s后揭下,贴于5 mm \times 5 mm大小的载玻片上,用体积分数95%乙醇固定5 min。进行过碘酸雪夫染色,以及免疫组织化学染色观察结膜上皮细胞中转化生长因子- β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)与核转录因子- κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)的表达情况。

1.3.6 ELISA检测 在受检者结膜囊内滴无菌生理盐水1滴,转动眼球使泪液与盐水充分混合,将毛细玻璃管轻置于穹隆结膜与球结膜交界处,轻轻按压后分别收集左右眼泪液,转移至同一微量离心试管中,将泪液标本置-20 $^{\circ}$ C保存备用。采用ELISA法检测泪液中趋化因子3(chemokine C-C ligand 3, CCL3)、CCL4、CCL5、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及VEGF的浓度。遵照试剂盒说明进行操作,吸光度A₄₅₀值采用酶标仪进行测定。绘制标准曲线:横坐标为标本浓度,纵坐标为A值。最后通过标本的A值在标准曲线上查出其浓度。

1.4 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析。对糖尿病组和正常对照组的BUT、SIT、FLS及两组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及VEGF的含量关联性采用 χ^2 检验;结膜印迹细胞学检查结果为等级资料,采用秩和检验;IL-6与各指标间采用Spearman进行相关性分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OSDI评分、BUT、SIT及FLS比较 糖尿病组BUT、SIT和FLS均明显低于正常对照组,OSDI评分明显高于正常对照组,两组之间差异均有统计学意义($P<0.001$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.001$ 、 $P=0.034$),见表1。

2.2 结膜印迹细胞学检查结果 糖尿病组的结膜杯状细胞数量极少,异常球结膜上皮细胞数较多,可见炎性细胞浸润,结膜上皮细胞大而稀疏,细胞核与细胞浆比值增大,可见双核细胞及杆状核染色质细

胞,少部分核呈“蛇样”改变。糖尿病组的结膜上皮细胞及杯状细胞数量与正常对照组相比均有所改变(图1)。正常对照组结膜杯状细胞数量较多,未见炎性细胞浸润。

表1 两组一般资料比较

参数	正常对照组	糖尿病组	P值
例数	84	102	0.852
年龄/岁	55.12 ± 6.31	52.03 ± 8.26	0.524
性别(男/女)	43/41	52/50	0.625
OSDI/分	9.52 ± 8.67	26.23 ± 9.65	<0.001
BUT/s	12.17 ± 2.31	3.64 ± 1.23	<0.001
SIT/mm	15.21 ± 3.25	7.16 ± 1.09	<0.001
FLS/分	3.56 ± 1.93	2.41 ± 2.13	0.034

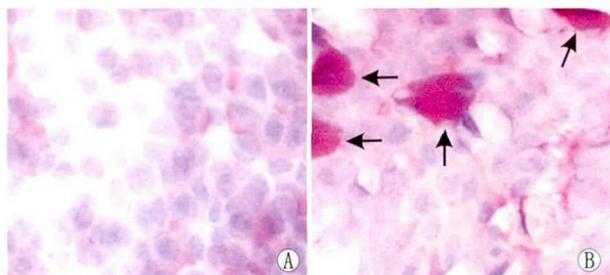


图1 糖尿病组和正常对照组的结膜印迹细胞检查结果。A:正常对照组结膜杯状细胞数量较多,未见阳性反应细胞;B:糖尿病组结膜上皮细胞大而稀疏,杯状细胞数量极少甚至消失,核极小甚至无核,少部分核呈“蛇样”改变(↑指示阳性反应细胞)

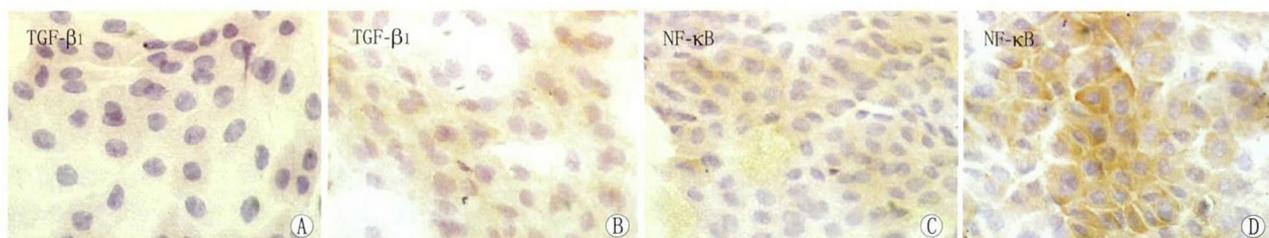


图2 免疫组织化学检测正常对照组(A、C)和糖尿病组(B、D)的结膜上皮细胞TGF-β₁与NF-κB表达。A:正常对照组结膜上皮细胞未见TGF-β₁深棕色阳性反应细胞;B:糖尿病组结膜上皮细胞见大量TGF-β₁深棕色阳性反应细胞;C:正常对照组结膜上皮细胞见NF-κB棕黄色阳性反应细胞;D:糖尿病组结膜上皮细胞可见大量NF-κB深棕色阳性反应细胞

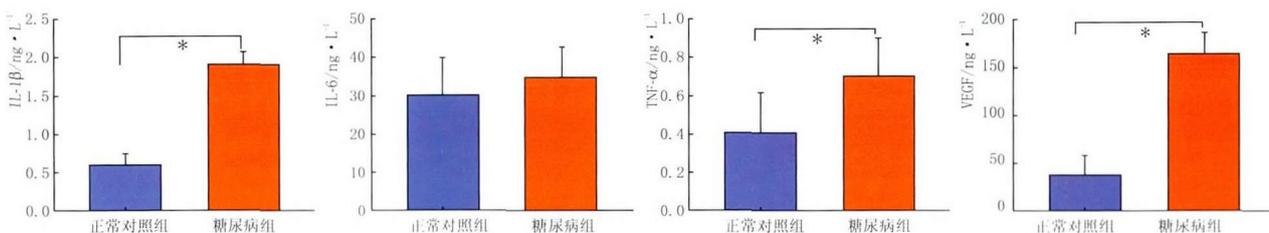


图3 糖尿病组泪液中IL-1β、TNF-α与VEGF表达明显高于正常对照组。与正常对照组比较,*P < 0.05

2.5 ELISA法检测CCL3、CCL4、CCL5表达 正常对照组的泪液中CCL3、CCL4、CCL5浓度分别为(23.21 ± 19.63) ng · L⁻¹、(6.52 ± 5.24) ng · L⁻¹以及(124.62 ± 35.61) ng · L⁻¹,糖尿病组分别为(89.35 ± 23.92) ng · L⁻¹、(196.32 ± 62.34) ng · L⁻¹

2.3 两组结膜上皮细胞中TGF-β₁和NF-κB的表达情况 正常对照组结膜上皮细胞的TGF-β₁表达为胞浆呈浅棕色阳性反应,糖尿病组结膜上皮细胞TGF-β₁表达为胞浆呈深棕色阳性反应。正常对照组结膜上皮NF-κB的表达为胞浆呈棕黄色阳性反应,糖尿病组结膜上皮细胞NF-κB表达为胞浆深棕色阳性反应。糖尿病组的TGF-β₁阳性表达率为81%,正常对照组为17%,糖尿病组的NF-κB阳性表达率为76%,正常对照组为21%。糖尿病组的TGF-β₁与NF-κB表达较正常对照组明显增强,差异均有统计学意义(P = 0.008、0.016;见图2)。Spearman相关性分析结果显示,糖尿病组结膜上皮细胞TGF-β₁表达与NF-κB表达呈显著正相关(r = 0.654, P = 0.005,图2)。

2.4 ELISA法检测IL-1β、IL-6、TNF-α及VEGF表达 糖尿病组的泪液中IL-1β、TNF-α及VEGF的表达均明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(P < 0.001、P = 0.023、P < 0.001;见图3)。糖尿病组的泪液中IL-6表达与BUT、SIT、结膜杯状细胞密度均具有显著相关性(r = 0.50, P = 0.02; r = 0.70, P < 0.001; r = 0.46, P = 0.04),但与泪液清除率无相关性(r = 0.41, P = 0.06),而正常对照组的泪液中IL-6表达与BUT、SIT、结膜杯状细胞密度无明显相关性(r = 0.19, P = 0.53; r = 0.20, P = 0.49; r = 0.31, P = 0.14;见图4)。

以及(262.39 ± 68.25) ng · L⁻¹。可见糖尿病组的泪液中CCL3、CCL4、CCL5浓度均明显大于正常对照组,差异均具有统计学意义(P < 0.001、P < 0.001、P = 0.012,图5)。

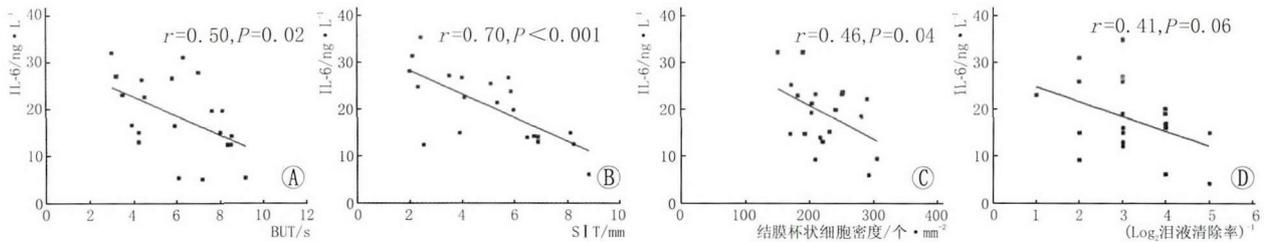


图4 糖尿病组患者的泪液中 IL-6 表达与 BUT(A)、SIT(B)、结膜杯状细胞密度(C)具有显著相关性,但与泪液清除率(D)无关

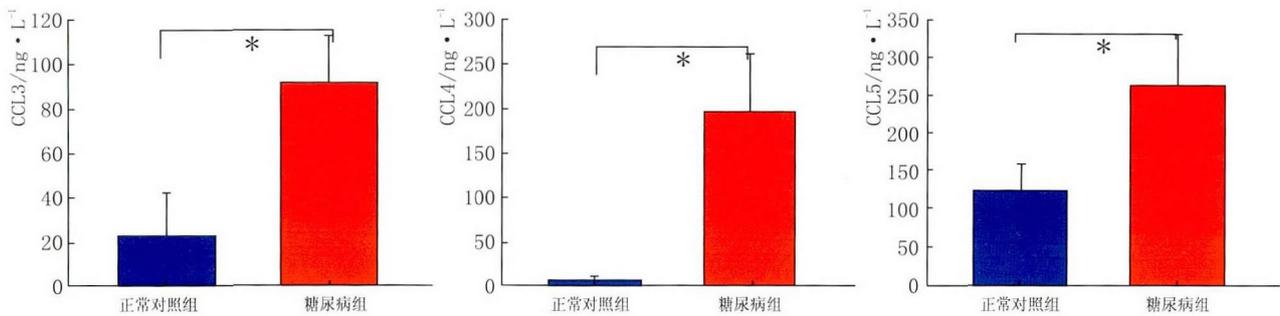


图5 糖尿病组患者的泪液中 CCL3、CCL4、CCL5 浓度明显高于正常对照组。与正常对照组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

近几年,随着糖尿病患者不断增加,糖尿病引起的眼部并发症已成为人们关注的焦点。糖尿病为系统性疾病,可诱发干眼的发病^[5]。干眼是一种由多因素相互作用的以泪液和眼表改变为特征的疾病,糖尿病人群更易通过多种机制来影响着泪膜的功能性和稳定性进而导致干眼的发生,其泪液的质量与成分都会受到影响^[6]。据相关研究报道^[7],结膜杯状细胞具有维持眼表功能的作用,糖尿病患者的泪膜稳定性较正常人下降与结膜杯状细胞密度减少有关,而其眼表的炎症反应对眼表功能的损害又起到关键作用。本研究旨在了解炎症因子在糖尿病性干眼患者结膜上皮细胞及泪液中的表达变化,以便及早对糖尿病性干眼进行诊治,对指导临床具有重要意义。

2017年国际干眼专题研究会对于干的最新定义为,干眼是眼表的多因素疾病,其特征是泪膜稳定性的下降,伴有眼部症状,其发病机制包括泪膜不稳定、泪液渗透压升高、眼表炎症和损害以及神经感觉异常^[8]。研究表明^[9]炎症是引起干眼病理损害的重要机制,眼表的炎症反应可以使结膜上皮细胞、结膜杯状细胞数量减少,从而导致泪膜稳定性下降,眼表受到损害。本研究对比糖尿病组与正常对照组的结膜上皮细胞及杯状细胞的形态和数量,结果显示糖尿病组结膜上皮细胞及杯状细胞数量较正常对照组明显减少,提示炎症反应可能是糖尿病性干眼患者眼表损害的诱发因素。

干眼患者眼表泪液成分的改变会刺激眼表产生更多的炎症因子,反过来炎症因子也会导致眼表机

能障碍以及分泌泪液细胞的丢失^[10]。越来越多证据表明 TGF、CCL、TNF 等炎症因子在干眼患者的泪液和结膜上皮细胞中呈高表达^[2,11],而这些参与炎症反应的各种细胞因子都受 NF- κ B 的调控。TGF- β_1 与 NF- κ B 作为多功能的炎症因子,对组织的凋亡、分化、炎症等免疫反应的调控具有重要作用^[12],本研究对糖尿病组和正常对照组的结膜上皮细胞进行免疫组织化学染色,糖尿病组患者结膜上皮细胞中 TGF- β_1 与 NF- κ B 的阳性表达率均明显高于正常对照组,糖尿病组患者结膜上皮细胞 TGF- β_1 表达与 NF- κ B 表达呈显著正相关,提示 TGF- β_1 与 NF- κ B 可能对糖尿病性干眼患者的眼表组织的凋亡与炎症有重要调控作用。

IL-1 β 是研究干眼最为广泛的炎症因子之一^[13],此后 IL-6、TNF- α 及 VEGF 也逐渐开始被研究,TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子可使 VEGF 表达上调,并参与体内的特异性与非特异性炎症反应^[14-15]。研究表明炎症和凋亡共同作用于干眼的发病过程,干眼可导致结膜上皮细胞及泪腺腺泡的凋亡增加,同时 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及 VEGF 等这些炎症因子又可促进凋亡,因此炎症因子被认为是干眼发病的核心^[12]。本研究采用 ELISA 法对糖尿病组和正常对照组泪液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及 VEGF 的浓度进行测定,糖尿病组的泪液中 IL-1 β 、TNF- α 及 VEGF 的浓度明显高于正常对照组,将糖尿病组的泪液中 IL-6 浓度与 BUT、SIT、结膜杯状细胞密度进行相关性分析,结果表明均有相关性,而正常对照组无相关性。由此我们推测 IL-6 可能与糖尿病性干眼发病的严重程度有关,而 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及 VEGF 作为重要的炎症因子,可能通过对眼表炎症反应和凋亡

的不断激活,进而不断对眼表产生损害。

糖尿病性干眼患者眼表炎症的激活不仅有 IL、TGF 的参与,CCL 可能也在其中发挥重要作用。本研究对两组泪液中 CCL3、CCL4、CCL5 浓度进行检测,结果显示其在糖尿病组的浓度明显高于正常对照组,由此推测 CCL 可作为糖尿病性干眼发病的重要生物标志物,以及在糖尿病性干眼患者的泪膜及眼表变化中具有重要作用,这些与 Barabino 等^[16]及 Benito 等^[17]的报道一致,更有研究发现 CCL 水平与干眼的诊断指标如 BUT、SIT 及结膜上皮细胞染色程度具有显著相关性^[18]。

综上所述,炎症因子对糖尿病性干眼的发病具有关键作用,IL-1 β 、CCL3、CCL4、CCL5、TNF- α 及 TGF- β_1 等都参与了糖尿病性干眼的发病,通过研究这些炎症因子在糖尿病性干眼患者结膜及泪液中的表达变化及意义,以便更好地对糖尿病性干眼患者进行治疗。

参考文献

[1] GAO Y,ZHANG Y,RU Y S,WANG X W,YANG J Z,LI C H,et al. Ocular surface changes in type II diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Int J Ophthalmol* 2015,8(2):358-364.

[2] LIU M,CHEN J. Curative effects of different medication time of prano-profen eye drops on dry eye [J]. *Rec Adv Ophthalmol* 2016,36(10):946-948.
刘明,陈琨.普拉洛芬滴眼液不同用药时间对干眼症疗效的影响[J].眼科新进展,2016,36(10):946-948.

[3] YE F,WANG C H,CHEN Y,SHI Y H,HUANG Z P. Effects of artificial tears on tear meniscus in dry eyes of diabetic patients [J]. *Rec Adv Ophthalmol* 2012,32(12):1148-1150.
叶芬,王春红,陈银,施宇华,黄振平.人工泪液对糖尿病干眼患者泪河的影响[J].眼科新进展,2012,32(12):1148-1150.

[4] NARAYANAN S,REDFERN R L,MILLER W L,MCDERMOTT A M,NICHOLS K K. Dry eye disease and microbial keratitis:is there a connection? [J]. *Ocul Surf* 2013,11(2):75-92.

[5] ALJAROUSA M,BADARUDIN N E,CHE-AZEMIN M Z. Comparison of dry eye parameters between diabetics and non-diabetics in district of kuantan,pahang [J]. *Malays J Med Sci* 2016,23(3):72-77.

[6] FUERST N,LANGELIER N,MASSARO-GIORDANO M,PIS-

TILLI M,STASI K,BURNS C,et al. Tear osmolarity and dry eye symptoms in diabetics [J]. *Clin Ophthalmol* 2014,8(8):507-515.

[7] TANG Y H,ZHOU W. Correlation studies between keratoconjunctival epithelial lesions and serum soluble e selectin in diabetic patients [J]. *Ophthalmol Res* 2009,27(5):416-419.
唐彦慧,周炜.糖尿病角结膜上皮病变和血清可溶性 E 选择素相关性研究[J].眼科研究,2009,27(5):416-419.

[8] CRAIG J P,CAFFERY B,JOO C K,LIU Z G,TSUBOTA K,STAPLETON F,et al. TFOS DEWS II definition and classification report [J]. *Ocul Surf* 2017,15(3):276-283.

[9] SU M C,HAO X L,ZHANG Z C. Inflammatory mechanism of ocular surface damage in dry eye [J]. *Int Eye Sci* 2015,15(5):821-824.
宿梦苍,郝晓琳,张仲臣.干眼症眼表损害炎症机制[J].国际眼科杂志,2015,15(5):821-824.

[10] COURSEY T G,DE-PAIVA C S. Managing Sjögren's syndrome and non-Sjögren syndrome dry eye with anti-inflammatory therapy [J]. *Clin Ophthalmol* 2014,8:1447-1458.

[11] GOEBBELS M. Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics [J]. *Br J Ophthalmol* 2000,84(1):19-21.

[12] CAI L P,ZHANG H. Research progress on inflammatory immunity related signaling pathway for the pathogenesis of dry eye [J]. *Int Eye Sci* 2016,16(6):1084-1088.
蔡丽萍,张宏.炎症免疫相关信号通路在干眼发病机制中的研究进展[J].国际眼科杂志,2016,16(6):1084-1088.

[13] HESSEN M,AKPEK E K. Dry eye:an inflammatory ocular disease [J]. *J Ophthalmic Vis Res* 2014,9(2):240-250.

[14] KWON J W,CHOI J A,SHIN E Y,LA T Y,JEE D H,CHUNG Y W,et al. Effect of trapping vascular endothelial growth factor-A in a murine model of dry eye with inflammatory neovascularization [J]. *Int J Ophthalmol* 2016,9(11):1541-548.

[15] SISTO M,LISI S,LOFRUMENTO D D,D'AMORE M,FRAS-SANITO M A,RIBATTI D. Sjögren's syndrome pathological neovascularization is regulated by VEGF-A-stimulated TACE-dependent crosstalk between VEGFR2 and NF- κ B [J]. *Genes Immun* 2012,13(5):411-420.

[16] BARABINO S,CHEN Y,CHAUHAN S,DANA R. Ocular surface immunity:homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease [J]. *Prog Retin Eye Res* 2012,31(3):271-285.

[17] BENITO M J,GONZALEZ-GARCIA M J,TESON M,GARCIA N,FERNANDEZ I,CALONGE M,et al. Intra- and inter-day variation of cytokines and chemokines in tears of healthy subjects [J]. *Exp Eye Res* 2014,120(2):43-49.

[18] NA K S,MOK J W,RHO C R,JOO C K. Correlations between tear cytokines,chemokines,and soluble receptors and clinical severity of dry eye disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012,53(9):5443-5450.