

液相芯片技术及其在泪液细胞因子检测中的应用

Liquichip Technology and Its Application in Tear Cytokine Analysis

李凯军 吴开力

中山大学眼科学国家重点实验室, 中山大学中山眼科中心, 广州 510060

Kaijun Li, Kaili Wu

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

摘要: 液相芯片技术是一种利用混悬在液相中的分类编码微球作为反应及信号检测载体, 集合流式细胞技术、激光技术、数字信号处理技术及传统化学技术为一体的新型生物分子检测技术。它充分利用发展成熟的流式细胞术检测原理, 对目标分子(如核酸、蛋白质等)进行高通量分析。目前已在生物医学研究中得到了广泛的应用。现就其技术原理、特点及其在泪液细胞因子检测中的应用作简要介绍。《眼科学报》2010; 25: 4-10.

关键词: 液相芯片; 细胞因子; 泪液

Abstract: Liquichip (Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays) is a new biomolecular detection technology using encoded microspheres suspended in liquid as reaction and detection carrier, which is an integration of flow cytometry, laser technology, digital signal processing and traditional chemical technology. It is a high-throughput analyzer for the target molecular (e.g. nucleic acid and protein) based on the principles of flow cytometry. Liquichip is now widely used in biomedical analyses. This article briefly reviews the principle and characteristic of liquichip and its application in tear cytokine analysis. *Eye Science* 2010; 25: 4-10.

Key words: Liquichip; Cytokine; Tear

一、液相芯片技术原理

液相芯片技术是一种以悬浮于液相中经过特殊编码、可识别的微球为载体, 应用流式细胞术原理同时检测多个生物分子(抗原、抗体、蛋白质、核酸等)的阵列分析技术^[1-6]。液相芯片的反应体系包括: 微球、探针分子、被检测物和报告分子(图1)。最常用的微球编码技术是光学信号(荧光、红外线、光散射、可见光)^[7]。微球内部的物质受激发后产生不同的信号, 从而将不同的特异性反应区

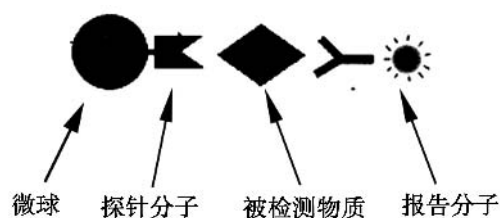


图1 液相芯片的组成系统及原理

分开来(定性、分类)。微球通过表面修饰的功能基团共价连结于能与被检测物特异性结合的探针分子。报告分子通常是一种能与被检测物特异性结合的标记有荧光的分子(如: 抗体、抗原、核酸等)。报告分子可为不同的特异性反应提供检测信号

广州市科技计划项目(2007J1-C0101)

通讯作者: 吴开力, E-mail: wukaili@mail.sysu.edu.cn

(定量)^[2]。先将编码的微球与探针分子结合(通常已由产品公司完成),再依次加入样品及报告分子。不同微球上的探针分子与样品中需要检测的各种目标分子进行特异性结合反应,目标分子再与报告分子发生特异性结合,即构成了一个液相芯片反应体系。可在同一混悬体系中对一样品中的多种目标分子进行同时分析。

目前商业化的液相芯片技术平台主要有:Luminex xMAP、BD™ FACSArray 生物分析仪、VeraCode™(Illumina) multiplex 技术等^[8]。Luminex xMAP 使用不同含量的两种荧光物质(红色和红外线)编码微球。这两种荧光物各有 10 中不同的强度,能够组合编码 100 种不同的微球。Luminex 检测仪(如:Lumine® 100/200™)分析通过进样管的单个微球的数个参数确定被检测物的质和量。首先微球被 635 nm 的红色激光激发,微球内的荧光物质受激发后发射出不同强度的荧光以区分不同类别的微球(定性)。然后,结合在微球上的报告分子被 532 nm 的绿色激光激发,根据记录到的荧光强度确定被检测物质的含量。Luminex 公司于 2007 年推出了新一代微球 MagPlex 微球,又称为磁珠(Magnetic beads),它的最大特点是微球带有磁性,使得整个检测过程可以自动完成,大大提高了检测速度。Luminex 最新推出的 FLEXMAP 3D™ 系统基本原理与 Lumine® 200™ 系统相似,使用三种不同浓度的荧光物质编码微球,可同时检测一个样本中的 500 种目标分子,并可一次检测 384 个不同样本^[8]。

BD™ FACSArray 生物分析仪(Cytometric Bead Array, BD™ CBA)依靠不同强度的单个荧光基团编码微球,能同时检测 30 种不同的目标分子。但 CBA 的优点可以是任何配备有 488 nm 的激发激光和能够检测和区分 576 nm 和 670 nm 发射激光的流式细胞仪进行分析。研究者可以在流式细胞仪上进行多个目标分子的检测。

VeraCode™(Illumina) multiplex 技术在 Illumina BeadXpress reader 上进行。它使用一种独特的数字全息技术编码石英玻璃微球,同时使用标准的荧光报告分子,如:藻红蛋白,Cy3 和 Cy5 等标记被检测物。高纯度的石英玻璃可减少背景荧光,提高检测灵敏度。该系统可同时检测 48 种目标蛋白的含量。当被激光激发时,微球内的全息物质使激光发生衍射产生独特的编码图像,可被内置的 CCD

照相机记录。通过分析获得的全息编码图像和报告分子的荧光区分不同的被检测物质的质和量。

最近的纳米半导体技术研究显示可以通过在多聚微球内精确地植入不同比例的不同大小量子点(硫化锌/硒化镉纳米晶体)达到多色光学编码^[9-10]。量子点荧光具有强度高、可同时发射不同波长光的特点,非常适合用于多通道检测。理论上使用 10 种不同强度的 6 种不同颜色可同是检测 106 种目标分子^[11]。

二、液相芯片技术在泪液细胞因子检测中的应用

1. 液相芯片技术应用于检测泪液细胞因子的探索

泪液中含有复杂的细胞因子成分,细胞因子可调节多种细胞功能,其浓度变化可引起一系列炎症反应,也可作为疾病恢复的信号和干眼等眼表疾病的标志物^[12-14]。既往,通常使用 ELISA 检测泪液中细胞因子的浓度。由于泪液样本微量,ELISA 只能检测泪液样本中复杂的细胞因子中的 1~2 个细胞因子的浓度,很难进行多个细胞因子间的比较,不能够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,存在需要大量检测样本、操作繁琐、费时等问题^[2, 15-16]。

液相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^[2, 6, 17]。对多个细胞因子水平进行全面监测与评价比监测单个细胞因子更能反应疾病发生与发展的整体变化。Morgan 等^[6]应用液相芯片技术检测了血浆、泪液、痰等不同标本中的 14 种细胞因子,并与 ELISA 法进行比较,结果表明两者之间具有较好的相关性。Narayanan 等^[18]利用液相芯片技术发现泪液中的 IL-1 β 水平较低(0.37~7.62 pg/ml),应用酶免疫分析法未能检测到。与 ELISA 相比,液相芯片技术的有效检测范围更宽,灵敏度相似或更高^[6, 19-20]。我们利用液相芯片技术和 ELISA 检测了正常人泪液中 EGF 浓度,两种方法的结果有良好的相关性^[21]。

最近,已有较多的研究应用液相芯片技术检测泪液中的各种细胞因子,但由于不同的技术平台及不同厂家提供的试剂盒所使用的标准品不一致,报道的各种细胞因子浓度的绝对值存在较大的差异(表 1)。Lafrance 等比较了 2 家应用液相芯片技术的仪器及 5 家厂商提供的试剂检测 91 位

表1 不同液相芯片试剂盒分析人泪液中各种细胞因子的含量

Cytokine (pg/ml)	Bio-Rad (Luminex)			BD (BD)			Invitrogen (Luminex)			Upstate (Luminex)			
	正常人 ^[17] n=33	青光眼药物 ^[38] n=21	正常人 ^[23] n=28	正常人 ^[31] n=15	吸烟 ^[39] n=12	角膜排斥 ^[40] n=3	正常人 ^[37] n=7	干眼 ^[37] n=7	正常人 ^[36] n=14	干眼 ^[36] n=30	SAC ^[32] n=12	VKC ^[32] n=18	AKC ^[32] n=6
IL-1α									1.0±0.0	73.8±239.8			
IL-1ra	9589.4±1453.7												
IL-1β	5.2±0.9	↑	20.9~1691.8			NS	436.3±116.7	664.3±148.8	3.0±5.8	57.7±207.1	↑	↑	↑
IL-2	61.9±9.2	↑		↑	NS		48.3±12.2	132±28.9			↑	↑	↑
IL-4	29.3±3.9	↑		↑	NS		264.3±90.2	420±70.9			↑	↑	NS
IL-5	13.7±3.0	↑		↑			156.9±39.6	289.4±57.3			↑	↑	↑
IL-6	35.2±5.5	↑	1.4~263.9		↑	↑	632.3±167.9	1625.7±430.9	26.5±21.8	238.0±278.2	↑	↑	↑
IL-7	382.3±32.3	↑											
IL-8	147.7±15.8	↑	8.3~1484.8		↑	↑	16791.4±2841	48508.6±9397	176±72	1510±1671	NS	NS	NS
IL-9	35.6±4.9												
IL-10	23.6±4.9	↑	2.7~262.5	↑	NS	↓	256.9±56	522±97	1.0±0.0	12.4±37.6	↑	↑	NS
IL-12		↑				↓			117.5±118.5	147.5±230.5	↑	↑	↑
IL-12p70	32.9±3.8	↑	1.7~714.9						111.4±64.1	152.6±167.8	↑	↑	↑
IL-13	19.6±2.4												
IL-15	14.0±1.8												
IL-17	72.2±12.7	↑											
TNF-α	175.9±74.6	↑	1.5~286.0	↑	NS	↓	250.6±63.2	435.7±145.6	126.8±44.5	464.4±392	NS	↑	NS
IFN-γ	331.6±52.2	↑		↑	NS		279.1±45.4	458.3±95.7	6.0±0.0	95.5±392.8	↑	↑	NS
RANTES	36.1±3.9								371±209.9	700.7±477.9*	NS	NS	NS
MIP-1α	26.2±3.3								1.5±0.5	334.5±237.9#			
MIP-1β	48.5±10.2	NS								3035±5510			
MCP-1	132.5±20.3	↑									↑	↑	↑
G-CSF	43.3±4.4	↑											
GM-CSF	95.7±22.4												
Eotaxin	293.7±30.3												
PDGF-bb	31.6±4.4										NS	↑	NS
VEGF	2608.5±249.8												
IP-10	23622.3±3500.6								1277±619	926±930			
EGF													

注：* 伴有睑板腺功能障碍的干眼患者，# 无睑板腺功能障碍的干眼患者，SAC：季节性变应性结膜炎，VKC：春季角结膜炎，AKC：特发性角结膜炎，NS：无显著变化。有显著变化的各种细胞因子浓度加粗表示。Bio-Rad、BD、Invitrogen、Upstate 为提供试剂的不同公司。

正常人(19~59岁)泪液中的6~27种细胞因子的准确性、稀释线性关系和稳定性。结果表明Luminex的仪器及Bio-Rad的试剂最适合应用于泪液的液相芯片分析,其应用于检测1~4 μl 的泪液仍具有较好的稀释线性关系($r > 0.80$, $P < 0.05$)^[17]。同时他们的结果还提示,泪液标本在25℃放置半小时仍保持稳定,对进行液相芯片分析没有影响。

由于泪液成分复杂,各种细胞因子含量差异大,应用液相芯片技术同时检测多种成分时尚需进行探索,协调优化各项检测条件。如样本的稀释倍数、检测抗体的浓度和如何排除基质的干扰效应^[8]。Martins等^[22]曾经报道,针对细胞因子检测过程中异嗜性抗体对检测目标的干扰问题,设计了特异性阻断剂,较好地解决了液相芯片技术应用中异嗜性抗体对多种细胞因子检测的干扰问题。

虽然理论上各实验室可以自行构建芯片,但目前应用液相芯片技术分析泪液的研究大多采样用商品化的液相芯片试剂盒,而商品化的液相芯片主要是针对细胞因子的产品,其在泪液的检测仍局限于常见的各种细胞因子。下面就已报道的分析结果进行总结。

2. 泪液中细胞因子的正常生理变化

了解泪液中细胞因子的正常生理变化是进一步发现不同疾病状态下泪液中细胞因子的变化的先决条件。利用液相芯片技术可以较简便的监测泪液中多种细胞因子的生理变化。目前已有关于泪液中各种细胞因子在一天中的变化情况、比较基础泪液与反射泪液、睁眼与闭眼泪液中各种细胞因子的差异的报道。Uchino等^[23]利用液相芯片技术检测28位正常成年人泪液中IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70和TNF- α 一天的变化情况相互影响。他们分别在09:00、12:00、16:00、21:00和24:00小时取样,虽然不同个体同种细胞因子水平相差较大,但其在一天中的变化都表现出特定的模式。IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12p70和TNF- α 在早晨和深夜轻度升高。IL-8在一天中维持较低的水平。促炎症因子与抗炎因子IL-10的比值一天中无明显变化。其结果提示细胞因子的昼夜节律变化可能影响眼表疾病患者一天中症状轻重变化。Sonoda等^[24]利用液相芯片技术检测23位正常人基础泪液和反射泪液中的IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70和TNF- α 水平,发现上述指标的水平

无明显差异,IL-8在反射泪液中较基础泪液明显降低。Uchino等^[25]利用液相芯片技术检测17位正常人09:00和闭眼(右眼)3小时后泪液中IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70和TNF- α 的含量,闭眼3h后,虽然不同个体的同种细胞因子水平不一样,但睁眼状态(左眼)泪液中的IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12p70和TNF- α 表现出相同的升高趋势,IL-8表现出相同的降低趋势。闭眼3h之后,闭眼状态(右眼)泪液中IL-10的升高程度明显低于睁眼状态(左眼),其它细胞因子无明显变化。IL-10为抗炎细胞因子,其降低可能促进眼表的炎症反应。

3. 过敏性结膜炎患者泪液中细胞因子的变化

过敏性结膜炎主要为IgE介导的I型超敏反应所致,还可表现为IV型超敏反应^[26-27]。特异性IgE异常增多介导肥大细胞脱颗粒,释放组胺、白三烯等活性介质,引发过敏反应。然而特异性IgE的上调机制尚未完全阐明。研究显示,B细胞合成IgE具有T细胞依赖性,由过敏原特异性CD4⁺T细胞诱导和调节^[28-29]。其中CD4⁺T细胞分泌的IL-4、IL-5、IL-6和TNF- α 促进IgE的合成,而IFN- γ 、IFN- α 、TGF- β 抑制IgE合成。利用液相芯片技术同时检测多种细胞因子,可以计算各种细胞因子的比值,以便更好的理解各种细胞因子间的相互作用及致病机制。Cook等^[30]利用液相芯片技术同时检测9位过敏体质和7位非过敏体质志愿者泪液中的6种细胞因子(IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10)发现过敏体质组与非过敏体质组相比:IL-10的含量明显低,而TNF- α /IFN- γ 、IL-5/IFN- γ 和IL-5/IL-10的比值明显升高(IL-10为抗炎细胞因子),IL-5/IFN- γ 比值的升高表明Th2介导的体液免疫反应在过敏体质组中的过敏反应起主要作用。Nivenius等^[31]利用液相芯片技术检测15位特发性角结膜炎患者和12位正常人IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-5和IL-10。6种细胞因子在特发性角结膜炎患者泪液中均升高,同时发现结膜体征的严重程度与TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4和IL-10的水平显著相关。表明Th1和Th2介导的免疫反应共同参与特发性角结膜炎的发病。Leonardi等^[32]利用液相芯片技术同时检测12位季节性变应性结膜炎患者,18位春季角结膜炎患者,6位特发性角结膜炎患者和14位正常人的IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、

IFN- γ 、TNF- α 、嗜酸性细胞活化趋化因子(Eotaxin)、MCP-1和RANTES的浓度。他们观察到所有患者的IL-1 β 、IL-2、IL-5、IL-6、IL-12、IL-13和MCP-1水平均较正常对照组升高,且这些细胞因子表现出显著的相关性。季节性变应性结膜炎患者和春季角结膜炎患者的IL-4、IFN- γ 和IL-10升高。Eotaxin和TNF- α 只在春季角结膜炎患者中升高。这些研究说明,利用液相芯技术可以更好的理解变应性疾病中多条细胞因子通路,并有可能开发新的有效的抗过敏药物。

4. 干眼患者泪液中细胞因子的变化

近年来随着免疫学和分子生物学的研究进展,发现细胞因子参与免疫和炎症反应,在干眼的发病机制中起十分重要的作用。文献报道干眼患者的结膜、泪腺组织和泪液中IL-6、TNF- α 、细胞间黏附因子-1(ICAM-1)等的含量和表达增加,并与干眼的损害程度呈正相关^[33-35]。Narayanan等^[18]利用液相芯片技术发现3例中度干眼患者和3例正常人的IL-1 β 水平都较低,表明在中度干眼患者中IL-1 β 不起调节作用。LAM等^[36]利用液相芯片技术比较了30位干眼患者和12位正常人泪液中EGF、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IFN- γ 、TNF- α 、IL-8、巨噬细胞炎症蛋白-1 α (MIP-1 α)和RANTES的含量。他们发现干眼患者泪液中IL-6、IL-8、MIP-1 α 和TNF- α 的浓度较正常对照组显著增高。其中,RANTES和IL-12在伴有睑板腺功能障碍的干眼患者泪液中的显著增高。无睑板腺功能障碍的干眼患者泪液中EGF含量显著减低。而且,IL-6与临床刺激症状有显著的相关性。表明炎症反应在干眼的发生发展中起重要作用,且部分细胞因子与睑板腺功能障碍有关。Morgan等利用液相芯片技术比较了7例干眼患者及7例正常人泪液中IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 和IL-8的含量,发现干眼患者中所有被检测的细胞因子均显著增高,提示各种细胞因子在干眼的发病中起着重要的作用^[37]。

上述研究表明,干眼病患者泪液中IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、MIP-1 α 、IFN- γ 、TNF- α 增高,EGF在无睑板腺功能障碍的干眼患者泪液中降低,RANTES和IL-12与睑板腺功能障碍有关。

5. 其它状态下泪液中细胞因子的变化

细胞因子参与眼表的各种生理病理变化。故除上述针对结膜炎和干眼征的研究外,也有针对

其它特定疾病的研究报道。Malvitte等^[38]利用液相芯片技术检测了21位长期滴用抗青光眼药物患者和12位正常人泪液中的17种细胞因子(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)、INF- γ 、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、MIP-1 β 、TNF- α)的含量。结果表明促炎症细胞因子(IL-1 β 、IL-6、IL-12和TNF- α)较正常对照组明显升高,Th1型细胞因子(INF- γ 、IL-2)和Th2型细胞因子(IL-5、IL-10、IL-4)也较正常对照组明显升高,其中Th1型细胞因子升高最显著。IL-8和MCP-1也有升高。表明长期滴用抗青光眼药物所致的结膜免疫反应可能是细胞免疫与体液免疫共同参与引起的,其中细胞免疫可能起主要作用。Rummenie等^[39]利用液相芯片技术比较了12位正常人暴露于吸烟环境前、暴露于吸烟环境下5分钟后及24小时后泪液中IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、TNF- α 和IFN- γ 的浓度,发现IL-6的含量在暴露于吸烟环境后显著增高。表明即使短暂的被动暴露于吸烟环境下也会引起眼表的炎症反应,进一步导致泪膜的不稳定及眼表上皮的损害。Fodor等^[40]利用液相芯片技术监测了12例角膜移植患者(9例成功,3例角膜内皮排斥反应)术后12~14个月,泪液中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8、IL-10和IL-12p70的含量。他们发现IL-6和IL-8的含量在发生角膜排斥反应的患者中显著增高,而IL-10、TNF- α 和IL-12p70的含量显著降低。泪液中IL-6、IL-8的升高和IL-10、TNF- α 、IL-12p70的降低可能提示角膜移植排斥反应的发生。

三、存在的问题和展望

利用液相芯片技术同时检测多种细胞因子,分析各种细胞因子变化及其相互关系。限制液相芯片技术在泪液分析应用的主要原因有:(1)缺少配对的检测抗体,泪液中含有大量的细胞因子,目前商业化的试剂盒所检测的目标细胞因子仍有限;(2)需要进行不同液相反应条件(样本的稀释倍数、检测抗体的浓度等)优化与匹配;(3)同一反应体系中存在交叉反应及基质干扰;(4)各种液相芯片技术及试剂盒所采用的标准不一致,不同研究所报道的各种细胞因子绝对值差异较大,需进一步统一相应的标准,并建立标准的实验方案,以增加各个研究之间的可比性。对于其临床应用,高

质量诊断用抗原和单克隆抗体的缺乏、商品化液相芯片试剂盒缺乏、昂贵的研制和商业价格是制约的主要因素。

然而, 由于液相芯片技术具有高通量、自动化、快速、灵敏、靶标多元化等特点, 并能克服泪液标本量少的缺陷, 在泪液检测中具有广阔的应用前景。随着液相芯片技术将日臻成熟完善, 成本降低, 同时分子标记和检测技术的发展将不断促进和丰富液相芯片的技术平台, 液相芯片技术将进一步应用于泪液中各种蛋白标记分子、核酸以及病原体的检测。

参考文献

- Beske OE, Goldbard S. High-throughput cell analysis using multiplexed array technologies [J]. *Drug Discov Today*, 2002, 7(18 Suppl): S131-135.
- Vignali DA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays [J]. *J Immunol Methods*, 2000, 243(1-2): 243-255.
- Nolan JP, Sklar LA. Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm [J]. *Trends Biotechnol*, 2002, 20(1): 9-12.
- Varro R, Chen R, Sepulveda H, et al. Bead-based multianalyte flow immunoassays: the cytometric bead array system [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 378: 125-152.
- Lim CT, Zhang Y. Bead-based microfluidic immunoassays: the next generation [J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(7): 1197-1204.
- Morgan E, Varro R, Sepulveda H, et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology [J]. *Clin Immunol*, 2004, 110(3): 252-266.
- Yingyongnarongkul BE, How SE, Diaz-Mochon JJ, et al. Parallel and multiplexed bead-based assays and encoding strategies [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2003, 6(7): 577-587.
- Hsu HY, Joos TO, Koga H. Multiplex microsphere-based flow cytometric platforms for protein analysis and their application in clinical proteomics-from assays to results [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(23): 4008-4019.
- Gao X, Nie S. Quantum dot-encoded beads. *Methods Mol Biol*, 2005, 303: 61-71.
- Nicewarner-Pena SR, Freeman RG, Reiss BD, et al. Submicrometer metallic barcodes [J]. *Science*, 2001, 294(5540): 137-141.
- Han M, Gao X, Su JZ, et al. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(7): 631-635.
- Acera A, Rocha G, Vecino E, et al. Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease [J]. *Ophthalmic Res*, 2008, 40(6): 315-321.
- Li S, Sack R, Vijmasi T, et al. Antibody protein array analysis of the tear film cytokines [J]. *Optom Vis Sci*, 2008, 85(8): 653-660.
- Solomon A, Dursun D, Liu Z, et al. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(10): 2283-2292.
- Prabhakar U, Eirikis E, Miller BE, et al. Multiplexed cytokine sandwich immunoassays: clinical applications [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 114: 223-232.
- Martins TB. Development of internal controls for the Luminex instrument as part of a multiplex seven-analyte viral respiratory antibody profile [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(1): 41-45.
- LaFrance MW, Kehinde LE, Fullard RJ. Multiple cytokine analysis in human tears: an optimized procedure for cytometric bead-based assay [J]. *Curr Eye Res*, 2008, 33(7): 525-544.
- Narayanan S, Miller WL, McDermott AM. Conjunctival cytokine expression in symptomatic moderate dry eye subjects [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(6): 2445-2450.
- Van der heyde HC, Burns JM, Weidanz WP, et al. Analysis of antigen-specific antibodies and their isotypes in experimental malaria [J]. *Cytometry A*, 2007, 71(4): 242-250.
- 谢冲, 王国民. Luminex 液相芯片的发展及应用 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2010, 37(2): 241-244.
- 张艳莉, 马璇, 黄强, 等. 应用流式微球技术检测人泪液表皮生长因子 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2006, 24(11): 1158-1161.
- Martins TB, Pasi BM, Litwin CM, et al. Heterophile antibody interference in a multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for quantitation of cytokines in human serum [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(2): 325-329.
- Uchino E, Sonoda S, Kinukawa N, et al. Alteration pattern of tear cytokines during the course of a day: diurnal rhythm analyzed by multicytokine assay [J]. *Cytokine*, 2006, 33(1): 36-40.
- Sonoda S, Uchino E, Nakao K, et al. Inflammatory cytokine of basal and reflex tears analysed by

- multicytokine assay [J]. *Br J Ophthalmol*, 2006,90(1):120-122.
25. Uchino E, Sonoda S, Nakao K, et al. Alteration of tear cytokine balance by eye closure: analysis by multicytokine assay [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2006,244(6):747-749.
 26. Keane-Myers A. The pathogenesis of allergic conjunctivitis [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2001,1(6):550-557.
 27. McGill JJ, Holgate ST, Church MK, et al. Allergic eye disease mechanisms [J]. *Br J Ophthalmol*, 1998,82(10):1203-1214.
 28. Wu C, Yang G, Bermudez-Humaran LG, et al. Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006,6(4):610-615.
 29. Blaiss MS. Epidemiology and pathophysiology of immunoglobulin E-mediated asthma [J]. *Allergy Asthma Proc*, 2005,26(6):423-427.
 30. Cook EB, Stahl JL, Lowe L, et al. Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics [J]. *J Immunol Methods*, 2001,254(1-2):109-118.
 31. Nivenius E, Montan PG, Chryssanthou E, et al. No apparent association between periocular and ocular microcolonization and the degree of inflammation in patients with atopic keratoconjunctivitis [J]. *Clin Exp Allergy*, 2004,34(5):725-730.
 32. Leonardi A, Curnow SJ, Zhan H, et al. Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures [J]. *Clin Exp Allergy*, 2006,36(6):777-784.
 33. Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, et al. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca [J]. *Curr Eye Res*, 1999,19(3):201-211.
 34. Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye [J]. *Am J Ophthalmol*, 2004,137(2):337-342.
 35. Gao J, Morgan G, Tieu D, et al. ICAM-1 expression predisposes ocular tissues to immune-based inflammation in dry eye patients and Sjogren's syndrome-like MRL/lpr mice [J]. *Exp Eye Res*, 2004,78(4):823-835.
 36. Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, et al. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome [J]. *Am J Ophthalmol*, 2009,147(2):198-205.
 37. Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, et al. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients [J]. *Cornea*, 2009,28(9):1023-1027.
 38. Malvitte L, Montange T, Vejux A, et al. Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs [J]. *Br J Ophthalmol*, 2007,91(1):29-32.
 39. Rummenie VT, Matsumoto Y, Dogru M, et al. Tear cytokine and ocular surface alterations following brief passive cigarette smoke exposure [J]. *Cytokine*, 2008,43(2):200-208.
 40. Fodor M, Gogolak P, Rajnavolgyi E, et al. Long-term kinetics of cytokine responses in human tears after penetrating keratoplasty [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2009,29(7):375-380.

(收稿日期:2010-06-10 编辑:杨江瑜)

(上接第3页)

11. Kim B, Tang Q, Biswas PS, et al. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis [J]. *Am J Pathol*, 2004,165(6):2177-2185.
12. Singh N, Higgins E, Amin S, et al. Unique homologous siRNA blocks hypoxia induced VEGF upregulation in human corneal cells and inhibits and regresses murine corneal neovascularization[J].*Cornea*, 2007,26(1):65-72.
13. Yu WZ, Li XX, She HC, et al. Gene transfer of kringle 5 of plasminogen by electroporation inhibits corneal neovascularization[J]. *Ophthalmic Res*, 2003,35(5):239-246.
14. Jessup CF, Brereton HM, Sykes PJ, et al. Local gene transfer to modulate rat corneal allograft rejection [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005,46(5):1675-1681.
15. Parker DG, Brereton HM, Klebe S, et al. A steroid-inducible promoter for the cornea[J]. *Br J Ophthalmol*, 2009,93(9):1255-1259.
16. Gong N, Pleyer U, Volk HD, et al. Effects of local and systemic viral interleukin-10 gene transfer on corneal allograft survival [J]. *Gene Ther*, 2007,14(6):484-490.

(收稿日期:2010-04-16 编辑:林薇薇)