

- [20] Song JW, Do KH, Jang SJ, et al. Blood biomarkers MMP-7 and SP-A predictors of outcome in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Chest, 2013, 143(5): 1422-1429.
- [21] Ley B, Brown KK, Collard HR. Molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 307(9): L681-L691.
- [22] Rosas IO, Richards TJ, Konishi K, et al. MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. PLoS One, 2008, 5(4): e93.
- [23] Richards TJ, Kaminski N, Baribaud F, et al. Peripheral blood proteins predict mortality in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185(1): 67-76.
- [24] Jenkins RG, Simpson JK, Saini G, et al. Longitudinal change in collagen degradation biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis from the prospective, multicentre PROFILE study[J]. Lancet Respir Med, 2015, 3(6): 462-472.
- [25] Han MK, Zhou YE, Murray S, et al. Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study[J]. Lancet Respir Med, 2014, 2(7): 548-556.
- [26] Molyneaux PL, Cox MJ, Willis-Owen SA, et al. The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(8): 906-913.
- [27] Kinder BW, Brown KK, McCormack FX, et al. Serum surfactant protein-A is a strong predictor of early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Chest, 2009, 135(6): 1557-1563.

(收稿日期: 2016-12-14 修回日期: 2017-07-01)

• 综述 • doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2017.25.046

Bio-Plex 悬液芯片技术在生命科学与临床医学中的应用*

陈奇¹, 谭秋麟², 廖俐雅²综述, 徐海燕^{1△}审校

(重庆市垫江县人民医院: 1. 消化内科; 2. 检验科 400060)

[关键词] Bio-Plex 悬液芯片技术; 核酸; 蛋白质; 检测; 高通量; 研究进展

[中图分类号] R446

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)25-3594-04

近年来,为了深入探索基因与蛋白,分子生物学技术也随之得到了长足的发展。酶联免疫吸附试验(ELISA)等技术应运而生,促进了临床医学的飞速发展。由于患者及疾病的异质性,单一因子检测的临床价值有限,比如对肿瘤检测最有价值的血清学标记物甲胎蛋白(AFP),对肝癌诊断的灵敏度不到70%,因此联合多种血清因子检测对于提高临床诊断价值尤为重要。在此基础上产生了一种高通量血清检测技术即悬液芯片技术。而在诸多悬液芯片中,尤其以美国伯乐公司(Biorad)生产的Bio-Plex悬液芯片最为常用。经过近年来的发展,Bio-Plex悬液芯片技术已广泛应用于生命科学及临床医学实验、诊断。目前,其主要应用于以下3个领域:基因组学、蛋白质组学及转化医学。

1 Bio-Plex 悬液芯片技术的原理及优缺点

1.1 Bio-Plex 悬液芯片技术的原理 Bio-Plex 悬液芯片技术是一种新型分子检测技术,集流式细胞术、激光、磁珠、数字信号处理及传统化学等技术为一体。它由100种不同荧光标记的一系列聚苯乙烯微球组成,微球内部染上两种不同的荧光染料,每个不同颜色的微球可耦联一种对应靶分子的特异探针。检测样品时,微球表面的探针分子与目标分析物结合,而未结合的分析物将被清洗去除。然后再通过Bio-Plex系统中的激光来测定、识别微球编码和分析物,并进一步同步定量分析样品中的多种不同的蛋白质、多肽、DNA片段及RNA片段。

1.2 Bio-Plex 悬液芯片技术的优点及局限 Bio-Plex 悬液芯片技术能够显著减少实验时间,减少劳动力,降低检测费用。

该技术可以降低样品需要量(12.5~50 μL 样品)^[1],并能进行多重检测(同时检测100个指标),可以显著提高单个样品的信息量,而且能够获得不同分析物之间相互关系的数据。与传统化学检测方法相比,Bio-Plex悬液芯片技术具有更宽的动态检测范围及更高的灵敏度。当然,Bio-Plex悬液芯片技术同样具有局限性,其主要缺点是进行多重检测血清中的特异性抗体时,有可能对实验造成干扰,而且不能连续监测样品中靶分子的浓度,也不能对样品中靶分子同微球上探针的结合情况进行监测。此外,由于Bio-Plex悬液芯片技术平台是一个开放系统,进行聚合酶链反应(PCR)多重检测时,PCR产物有可能对实验室造成污染。

2 Bio-Plex 悬液芯片技术在基因组学中的应用

与传统的平板核酸芯片技术相比,Bio-Plex悬液芯片技术在应用于高通量基因表达分析时,其使用更加灵活、简便,可按照要求随意组合。Bio-Plex悬液芯片技术检测核酸的方法主要有直接DNA杂交、靶点特异性引物延伸技术、竞争性DNA杂交。目前最主要采用的仍然是直接杂交法,其原理是先用PCR特异性扩增生物素标记目标DNA,扩增产物变性后与耦联到微球表面的特异性核酸探针杂交,之后加入链亲和素标记的藻红蛋白,再洗脱未结合的DNA,最后通过悬液芯片系统检测。目前,在核酸检测方面,悬液芯片技术主要应用于单核苷酸多态性(SNP)分析、病原体的检测、核苷酸测序、人类白细胞抗原(HLA)分型等。

2.1 SNP 分析 悬液芯片技术在发明的初期已经应用于

* 基金项目:重庆市社会民生科技创新专项项目(CSPC2015SHMSZX1066)。 作者简介:陈奇(1988—),硕士,主治医师,主要从事消化内科工作。 △ 通信作者,E-mail:371079123@qq.com。

SNP 分析^[2]。McNamara 等^[3]在 2006 年用液态芯片技术 (xTAG) 对恶性疟原虫的感染进行 SNP 分析, 提高了疟疾诊断方法的特异性和敏感性, 并能提高少数物种中混合疟原虫物种的感染的诊断率。Bortolin 等^[4]对血栓形成患者相关的 SNP 进行检测后发现, 与传统的 PCR 方法相比, 悬液芯片法对基因多态性的检测更为准确。Koo 等^[5]对 ATP 结合盒转运蛋白的 SNP 进行了分析, 发现 ATP 结合盒转运蛋白的多态性与化疗后患者对药物的耐药性密切相关。

2.2 多重病原体的检测及分析 Bio-Plex 悬液芯片技术检测及分析多重病原体, 可以用于常规疾病诊断、疫苗研究及大规模的流行病学研究。目前主要应用于检测呼吸道病原体、肠道致病细菌或病毒及人乳头瘤病毒 (HPV) 等病原体。为了能同时检测出多达 20 种呼吸道病毒, Mahony 等^[6]同时检测甲型 (包括其亚型 H5 中的 H5N1) 和乙型流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型、腺病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒 NL63 和 HKU1 等, 并认为这可以作为一个定点试验对全球新出现的流感病毒进行监视。此外, Lee 等^[7]在 Bio-Plex 悬液芯片检测技术基础上开发了一种新的检查方法 (RMA), 能提高多重呼吸道病原体检测的特异性和灵敏性。

在检测肠道致病细菌或病毒方面, 通过运用悬液芯片技术对美国最常见的 6 种沙门菌血清型及副伤寒血清型 A 在 45 min 内进行检测, 有研究发现这项结果准确性达到 94.3%。而 Liu 等^[8]同样应用该技术检测轮状病毒、肠道腺病毒等 7 种病毒, 悬液芯片技术对病毒检测的敏感度及特异度分别达到 75% 及 97%。

HPV 是导致宫颈癌的主要因素^[9], Schmitt 等^[10]采用该技术对 22 种高危 HPV 进行基因分型, 能更好地应用于临床的快速诊断及治疗。在病原体检测方面, 与传统的 PCR 方法的诸多局限不同, Bio-Plex 悬液芯片检测法具有更简便、准确度更高、高通量等特点, 不仅能在短时间内准确对病原体进行检查, 并且在大样本的流行病学研究及疫苗接种等研究中更能发挥巨大作用。

2.3 HLA 基因分型 悬液芯片技术还能对 HLA DNA 进行分型。Itoh 等^[11]采用直接杂交法对 1 018 名日本人中 HLA A、B、C 和 DR B1 进行分型, 结果其准确率分别达到 85.91%、85.03%、97.32% 及 90.67%。Ozaki 等^[12]使用悬液芯片技术等多种技术来对日本人群中 HLA 的 9 个位点进行检测, 其检测结果与既往多个试验结果基本相符。

3 Bio-Plex 悬液芯片技术在蛋白质检测中的应用

传统的生物化学方法 (如酶联免疫吸附试验、蛋白印迹法等) 在蛋白质组学研究中可以了解单个蛋白的结构及功能, 但对于该蛋白质对细胞或机体的影响及其机制却不能了解, 更不能了解细胞或机体整体性状的变化。而 2D 电泳和质谱分析法则只能在蛋白的结构和功能的基础上, 有限地发现一些影响其他蛋白表达的未知蛋白质标志分子。而悬液芯片技术在蛋白质组学领域中的应用, 特别是通过对各种细胞因子的检测, 则能更好地解决这个问题。

3.1 Bio-Plex 悬液芯片技术应用于炎症的检测 除了 C 反应蛋白 (CRP)、降钙素原 (PCT) 等有限的指标外, 许多非特异性炎症均无常规的检测指标, 且无合适的检测手段进行检测, 但 Bio-Plex 悬液芯片技术为检测多个部位的各种炎症提供了一个新的思路。

季节性过敏性鼻炎 (SAR) 的诊断目前尚没有常规检测指标, 而 König 等^[13]在一项关于加拿大人过敏性鼻炎的研究中发现, 44 例 SAR 患者与 45 例常年性鼻炎 (PAR) 患者和 48 例

健康受试者, 通过 Bio-Plex 悬液芯片技术测定三者的鼻腔分泌物的多种细胞因子并进行分析, 结果发现, 嗜酸性阳离子蛋白 (ECP)、类胰蛋白酶、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 和巨噬细胞炎症反应蛋白-1 β (MIP-1 β) 是合适的标记物来区分过敏性鼻炎 (AR) 与健康受试者。因此, 这项研究所采用的方法可以发展成为一种诊断工具应用于临床常规诊断日常过敏性鼻炎。

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是一个重要的全球健康问题, 它会导致慢性炎症, 并导致不可逆的气道损伤, Geetanjali 等^[14]认为, 不同血清细胞因子水平可以作为 COPD 炎症和肺功能的替代生物标志物。为此, 他们通过悬液芯片技术对 30 例试验对象 (对照组 9 例, COPD 21 例) 的 48 个细胞因子水平进行了检测, 结果发现, 与对照组相比, 皮肤 T 细胞趋化因子、嗜酸细胞活化趋化因子、肝细胞生长因子、白细胞介素 (IL)-6、IL-16 和干细胞因子在 COPD 患者中明显增高。值得一提的是, 这项研究确定了干细胞因子可作为 COPD 的生物标志物。

3.2 Bio-Plex 悬液芯片技术应用于肿瘤的检测 随着发病率 and 病死率增加, 癌症是中国的主要死因和重大公共卫生问题。肺癌是癌症中最常发生及最主要的死亡原因, 胃癌、食管癌和肝癌也常被确诊亦被认为是癌症主要的死亡原因。因此如何快速灵敏地检测出肿瘤是一个急需解决的问题^[15]。血清中肿瘤标志物种类较多, 如 AFP、前列腺特异性抗原 (PSA)、癌胚抗原 (CEA)、糖类蛋白 (CA) 125、CA19-9 等, 但除了 AFP 敏感性大于 70% 以外, 其他许多肿瘤标志物敏感性均较低, 且对早期肿瘤并无有效的血清检测指标。目前广泛应用于肿瘤筛查的肿瘤标志物缺乏对人群早期疾病检测所需的敏感性和特异性, 为此, 广大研究机构需要进一步寻找敏感性及特异性较高的肿瘤标志物, 以便能在早期检测出肿瘤。而 Bio-Plex 悬液芯片技术则为此提供了一种新的检测手段。近年来, 重庆市垫江县人民医院已经通过 Bio-Plex 悬液芯片技术, 致力于建立结肠癌患者血清样本库, 力图将该技术进行转化医学研究, 有助于提高结肠癌患者诊治水平。

Mahboob 等^[16]通过 Bio-Plex 悬液芯片技术对结肠癌 Dukes 分期 A~D 级患者各 15 例及健康受试者 15 例血浆标本中的 27 个细胞因子进行检测, 结果发现 CEA、IL-8 和催乳素与结肠癌分期显著相关, 因此他们认为联合检测 CEA、IL-8 和催乳素 (PRL) 表达, 可以作为一种生物标记, 用于区分正常 (不受影响)、结肠癌非恶性和结肠癌恶性的不同阶段。

在另外一项关于丙型肝炎、肝硬化、肝癌的研究中, Costotini 等^[17]使用 Bio-Plex 悬液芯片技术检测丙型肝炎、肝硬化及肝癌患者血清中多种细胞因子, 研究结果表明: (1) 只有在肝硬化和肝细胞肝癌患者的血清中检测出高水平的肝细胞生长因子 (HGF) 和 PRL; (2) 在丙型肝炎、肝硬化、肝癌患者血清中, 均可检测出高水平的可溶性人表皮生长因子受体 2 (sHER-2/neu), siL-6Ra, 瘦素 (LEP) 和血小板内皮细胞黏附分子 1 (PECAM-1), 表明这 4 种蛋白可能是肝炎发展至肝硬化、肝癌的生物标记; (3) siL-6R 的血清水平与肝炎患者的 Child-Pugh 评分、肝硬化患者的肝纤维化阶段及肝癌患者肿瘤的大小均有关, 证实该蛋白可作为肝炎、肝硬化及肝癌发展过程中的一个预测因子。此外, 他们还同时证明了存在 5 个相关蛋白质, 包括 ErbB-2、siL-6Ra、PRL、HGF 和 LEP。

皮肤恶性黑色素瘤早期诊断较困难, 为此, 许多研究者进行了相关实验进一步寻找皮肤恶性黑色素瘤的血清生物学指标。在最新研究中, Kucera 等^[18]对 175 例黑色素瘤和 61 例健康人进行研究, 黑色素瘤患者根据 Breslow 评分分为 4 组, 探讨 IL-2、IL-6、IL-8、IL-10 血浆水平是否与黑色素瘤的检测及

前哨淋巴结转移阳性存在相关性。结果发现,在 Breslow 评分每个阶段血浆 IL 水平存在显著改变;在 Breslow 评分第 1 阶段,IL-2、IL-6 和 IL-10 检测结果呈阳性;在 Breslow 评分第 2 阶段 IL-2、IL-6、IL-8 检测结果呈阳性。通过比较阳性和阴性的前哨淋巴结转移组,IL 水平差异显著。因此,他们认为 IL-2、IL-6 和 IL-10 是诊断早期黑色素瘤的有效生物标志物,IL-2 和 IL-6 也可以作为判断其预后的生物标志物。

3.3 Bio-Plex 悬液芯片技术应用于其他方面的检测 目前,Bio-Plex 悬液芯片技术已广泛应用于蛋白质组学、转化医学、病理和药理的研究等领域中,并且一些公司针对性地研发出了一些蛋白质检测产品试剂盒。因此,Bio-Plex 悬液芯片技术除了可以用于检测炎症、肿瘤等疾病外,其他一些难以检测的细胞因子、蛋白也可以凭借这项技术进行检测。

Wong 等^[19]认为,代谢因素同样会影响慢性乙型肝炎自然发展。为此,他们采用了 Bio-Plex 悬液芯片技术对中国人群中 266 例慢性乙型肝炎患者的脂肪炎性因子[包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6、脂联素、LEP、抵抗素]进行检测,并对患者行常规肝活检后组织切片及其他临床实验室检测,研究发现,脂联素可防止胰岛素抵抗和肝脏脂肪变性,但对肝损伤无影响,而 TNF- α 、IL-6 及乙型肝炎病毒量和病毒基因型均是损伤肝脏的独立因素。Keller 等^[20]将炎症细胞中的 Caspase-1 进行 RNAi 处理,并对 Caspase-1 的 RNAi 细胞和对照组细胞进行紫外照射,刺激其分泌多种细胞因子,然后测定这些样品分泌的 27 种细胞因子。结果发现对照组中 IL-1 β 水平是 Caspase-1 RNAi 组的 3 倍,而其他细胞因子如 IL-1 α 、MIP-1 α 、TNF- α 、GM-CSF、IFN- γ 等,对照组也明显高于 Caspase-1 RNAi 组。因此,Keller 等认为,Caspase-1 在非传统蛋白质分泌的调节中起到了重要作用。Albulescu 等^[21]则通过 Bio-Plex 悬液芯片技术发现,一种特殊类型的间质细胞 TCs 细胞(telocytes)可能通过旁分泌途径影响心脏干细胞(cardiac stem cells,CSCs),它在 CSCs 的分化和增殖中起调节作用。

通过 Bio-Plex 悬液芯片技术对一些难以检测到的细胞因子、蛋白进行检测过程中,不仅进一步了解了这些分子、蛋白的作用,并能进一步了解其表达机制,因此,在现代检测技术中,Bio-Plex 悬液芯片技术应该进一步推广。

4 Bio-Plex 悬液芯片技术在转化医学中的应用

机体内分子和细胞水平的病变远远早于组织和器官,传统基础医学及临床医学无法解决这个难题,在此基础上,出现了转化医学。转化医学直接关联基础医学与临床医疗,聚焦具体疾病,可以发现或部分发现早期已经发生分子和细胞水平的病变,并把这些基础研究获得的知识、成果快速转化为临床上的治疗新方法,为临床提供新疗法、新药物^[22]。目前,Bio-Plex 悬液芯片技术是从分子和细胞水平进行转化型研究的重要手段,特别是对某一类蛋白表达谱分析,从而找到能预警疾病不同发展阶段和指导用药的生物标志物。

目前认为炎症在急性缺血性脑卒中的进展中起重要作用,为了证实这个观点,Ormstad 等^[23]测定了 45 例急性缺血性脑卒中患者的 13 种血清细胞因子,并研究这些细胞因子与脑卒中的关系。他们在 72 h 内对 45 例脑卒中组及 40 例对照组的血液标本进行采集,并在其发病 1~7 d 后进行分析。结果发现,急性缺血性脑卒中患者血清中 IL-1、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-18 和 GRO- α (CXCL1)均明显高于对照组,因此他们认为,通过测定急性缺血性脑卒中患者血液中多种细胞因子能早期发现急性缺血性脑卒中的炎症反应。

Gauglitz 等^[24]则在另外一项关于严重烧伤患者吸入性损

伤研究中,通过测定 IL-1 β 、IL-2、IL-4、G-CSF、CM-CSF 等 17 种细胞因子,来明确未存活及存活患者血清中各种细胞因子含量的差异,从而作为吸入性损伤患者存活的预警因子。结果发现,在入院后的前 7 d 中,与存活的患者相比,未存活患者血清中细胞因子 IL-6、IL-10、IL-7 均明显升高。而测定血清中 IL-6、IL-7、IL-10 水平较为方便和简单,因此,可以通过检测这些因子作为烧伤后患者是否有死亡风险的预警因子。

另外,悬液芯片技术同样可应用于临床指导用药。表皮生长因子受体的酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)已在非小细胞肺癌的靶向治疗中得到广泛应用,但 EGFR-TKI 并非对所有非小细胞肺癌患者均有效,EGFR 基因突变型别不同,肺癌患者接受 EGFR-TKI 治疗疗效也不同^[25]。在此基础上,Guo 等^[26]通过 xTAG 液相芯片技术检测 EGFR 基因第 18~21 号外显子的突变情况,评价 xTAG 液相芯片法检测的敏感性和特异性。结果发现,2000—2012 年中国大陆 1 139 例肺癌患者中,共获得 1 134 例患者基因突变检测结果,检测成功率达到了 99.56%,因此他们认为采用 xTAG 液相芯片法可有效检测肺癌 EGFR 基因突变,实现突变分型,进而指导临床药物 EGFR-TKI 治疗非小细胞肺癌。

除此之外,悬液芯片技术也同样广泛应用于其他各种疾病的研究。比如 Estep 等^[27]通过悬液芯片技术发现 Ghrelin 基因的产物在非酒精性脂肪性肝炎(NASH)及纤维化中起到重要作用。Niu 等^[28]则发现血管生成和促炎标志物的水平在镰刀形细胞贫血病的青少年患者中明显升高,并有可能加重肺动脉高压的风险。综上所述,基于 Bio-Plex 悬液芯片技术的转化医学可以明确早期已经发生分子和细胞水平的病变,并且这个结果也能进一步指导临床个体化用药治疗。Bio-Plex 悬液芯片技术在转化医学中扮演了十分重要的角色。

5 Bio-Plex 悬液芯片技术的前景及展望

Bio-Plex 悬液芯片技术从发明至今仅十多年时间,但是已经广泛应用于生命科学研究中的各个领域。Bio-Plex 悬液芯片技术虽然仍有一些缺点,比如多种反应物检测时混合交叉的干扰,不能连续监测待测样品中靶标物的浓度,多重 PCR 时技术操作复杂,数据的处理尚不够优化等等,但可以预期的是,随着 Bio-Plex 悬液芯片技术水平的完善,未来 Bio-Plex 悬液芯片技术将逐渐取代传统的 ELISA 等检测手段,能够在临床医学检验、基础医学的研究、新型药物的研发、公共卫生等大型基础领域方面发挥重要作用,而在临床上能进一步广泛应用于多种疾病的基因诊断、多种疾病各阶段的预警分子检测、感染性疾病病原体鉴别、临床个体化药物治疗等方面,最终能够从分子和细胞水平的层面上产生一场新的技术革命。

参考文献

- [1] Gumulya Y, Sanchis J, Reetz MT. Many pathways in laboratory evolution can lead to improved enzymes; how to escape from local minima[J]. *Chem Bio Chem*, 2012, 13(7): 1060-1066.
- [2] Ye F, Li MS, Taylor JD, et al. Fluorescent microsphere-based read out technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification[J]. *Human Mutation*, 2001, 17(4): 305-316.
- [3] McNamara DT, Kasehagen LJ, Grimberg BT, et al. Diagnosing infection levels of four human malaria parasite species by a polymerase chain reaction/ligase detection reaction fluorescent microsphere-based assay[J]. *Am J Trop*

- Med Hyg, 2006, 74(3): 413-421.
- [4] Bortolin S, Black M, Modi H, et al. Analytical validation of the tag-it high-throughput microsphere-based universal array genotyping platform; application to the multiplex detection of a panel of thrombophilia-associated single-nucleotide polymorphisms [J]. Clin Chem, 2004, 50(11): 2028-2036.
- [5] Koo SH, Ong TC, Chong KT, et al. Multiplexed genotyping of ABC transporter polymorphisms with the Bioplex suspension array[J]. Biol Proced Online, 2006, 9(1): 27-42.
- [6] Mahony JL, Chong S, Merante F et al. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(9): 2965-2970.
- [7] Lee WM, Grindle K, Pappas T, et al. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2626-2634.
- [8] Liu Y, Xu ZQ, Zhang Q, et al. Simultaneous detection of seven enteric viruses associated with acute gastroenteritis by a multiplexed luminex-based assay[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2384-2389.
- [9] Hausen H. Apillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account[J]. Virology, 2009, 384(2): 260-265.
- [10] Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, et al. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(2): 504-512.
- [11] Itoh YL, Mizuki N, Shimada T, et al. High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and-DRB1 loci by a PCR-SSOP-luminex method in the Japanese population[J]. Immunogenetics, 2005, 57(2): 717-729.
- [12] Ozaki Y, Suzuki S, Kashiwase K, et al. Cost-efficient multiplex PCR for routine genotyping of up to nine classical HLA loci in a single analytical run of multiple samples by next generation sequencing[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 318.
- [13] König K, Klemens C, Eder K, et al. Cytokine profiles in nasal fluid of patients with seasonal or persistent allergic rhinitis[J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2015, 11(1): 26.
- [14] Geetanjali B, Meraj Ak, Akhilesh KS, et al. Serum cytokine profiling and enrichment analysis reveal the involvement of immunological and inflammatory pathways in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2014(9): 759-773.
- [15] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [16] Mahboob S, Ahn SB, Cheruku HR, et al. A novel multiplexed immunoassay identifies CEA, IL-8 and prolactin as prospective markers for Dukes' stages A-D colorectal cancers[J]. Clinical Proteomics, 2015, 12(1): 10.
- [17] Costantini S, Capone F, Maio P, et al. Cancer biomarker profiling in patients with chronic hepatitis C virus, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Rep, 2013, 29(6): 2163-2168.
- [18] Kucera R, Topolcan O, Treskova I, et al. Evaluation of IL-2, IL-6, IL-8 and IL-10 in malignant melanoma diagnostics[J]. Anticancer Res, 2015, 35(6): 3537-3541.
- [19] Wong VW, Wong GL, Yu J, et al. Interaction of adipokines and hepatitis B virus on histological liver injury in the Chinese[J]. Am J Gastroenterol, 2010, 105(1): 132-138.
- [20] Keller M, Rüegg A, Werner S, et al. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion [J]. Cell, 2008, 132(5): 818-831.
- [21] Albuлесcu R, Tanase C, Codrici E, et al. The secretome of myocardial telocytes modulates the activity of cardiac stem cells[J]. J Cell Mol, 2015, 19(8): 1783-1794.
- [22] Collins F. The bridge between lab and clinic[J]. Nature, 2010, 468(7326): 877.
- [23] Ormstad H, Aass HC, Lund-Sørensen N, et al. Serum levels of cytokines and C-reactive protein in acute ischemic stroke patients, and their relationship to stroke lateralization, type, and infarct volume[J]. J Neurol, 2011, 258(4): 677-685.
- [24] Gauglitz GG, Finnerty CC, Herndon DN, et al. Are serum cytokines early predictors for the outcome of burn patients with inhalation injuries who do not survive? [J]. Critical Care, 2008, 12(3): R81.
- [25] Wu JY, Yu CJ, Chang YC, et al. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "Uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(11): 3812-3821.
- [26] Guo YJ, Wang W, Sha FU, et al. Clinical applicability of xTAG liquidchip technology as EGFR mutations detection method in lung cancer[J]. Clin Exp Pathol, 2014, 30(11): 1242-1246.
- [27] Estep M, Abawi M, Jarrar M, et al. Association of obestatin, ghrelin, and inflammatory cytokines in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Obes Surg, 2011, 21(11): 1750-1757.
- [28] Niu X, Nouraiе M, Campbell A, et al. Angiogenic and inflammatory markers of cardiopulmonary changes in children and adolescents with sickle cell disease[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7956.