DOI: 10.16016/j.1000-5404.201510041

髓样分化蛋白-2 模拟肽抑制巨噬细胞吞噬革兰阴性菌

王 虎[1],杨俊霞[1],黄家君[1],周运江[1],随何欢[1],朱 江[2],吴友莉[2],段光杰[2] (400016 重庆,重庆医科大学药学院药理学教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军临床病理学研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨髓样分化蛋白-2 模拟肽(MD-2 mimetic peptide,MDMP)对巨噬细胞吞噬革兰阴性菌的影响及所致炎症因子分泌的抑制效应。**方法** 采用 PCR 从 pEGFP-C3 质粒中扩增出表达 EGFP 的基因片段,通过基因重组构建原核表达载体 pET-32a(+)-EGFP,经测序鉴定后,转化至大肠杆菌 BL21(DE3)PLysS 中筛选出稳定表达的重组菌 pET-32a(+)-EGFP-BL21(DE3)PLysS(简称为 EGFP-BL21)。以 IPTG 诱导重组质粒表达后,通过免疫荧光和流式细胞术检测 RAW264.7 细胞对 EGFP-BL21 的吞噬能力以验证 EGFP-BL21 的构建情况。进一步检测 RAW264.7 细胞对经不同浓度 MDMP(1.0、10、100 μg/mL)预处理后的 EGFP-BL21 的吞噬效应;采用 ELISA 检测细胞培养上清液中 TNF-α 和 IL-6 的分泌水平。**结果** 筛选获得稳定表达 EGFP 的重组大肠杆菌 BL21(DE3)PLysS,重组菌经巨噬细胞 RAW264.7 吞噬后流式和激光共聚焦检测结果显示细胞内出现明显的绿色荧光。MDMP 预处理后,流式检测结果显示 RAW264.7 细胞对 EGFP-BL21 的吞噬能力受到明显抑制,预处理组(10、100 μg/mL)的吞噬系数(PI)显著低于经血清调理的阳性对照组($P<0.01$),且细胞培养上清 TNF-α 和 IL-6 的分泌水平显著降低($P<0.01$)。**结论** MDMP 预处理可明显抑制 RAW264.7 细胞对革兰阴性菌的吞噬作用,并降低该过程中炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的分泌。

[关键词] 髓样分化蛋白-2 模拟肽;革兰阴性菌;吞噬

[中图法分类号] R378;R392-33;R392.11 [文献标志码] A

Inhibitory effect of myeloid differentiation protein-2 mimetic peptide on phagocytosis of macrophage to Gram-negative bacteria

Wang Hu[1], Yang Junxia[1], Huang Jiajun[1], Zhou Yunjiang[1], Sui Hehuan[1], Zhu Jiang[2], Wu Youli[2], Duan Guangjie[2] ([1]Department of Pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the inhibitory effect of myeloid differentiation protein-2 mimetic peptide (MDMP) on the phagocytosis of macrophage to Gram-negative bacteria and on TNF-α and IL-6 secretion in this process. **Methods** Enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene fragment was amplified from pEGFP-C3 plasmid by PCR. The prokaryotic expression vector pET-32a(+)-EGFP was constructed by gene recombination. After sequencing, *Escherichia coli* BL21 (DE3) PLysS was transformed with the vector to screen recombinant bacteria pET-32a(+)-EGFP-BL21 (DE3) PLysS (EGFP-BL21) with stable expression of EGFP. The expression of recombinant plasmid was induced with IPTG, and the phagocytic ability of RAW264.7 cells to EGFP-BL21 was detected by immunofluorescence assay and flow cytometry. And

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171848);第三军医大学青年人才创新基金(SWH2011023)

[通信作者] 杨俊霞,电话:(023)68485161,E-mail:yangjunxia1234@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151230.1141.012.html(2015-12-30)

then, the effect of MDMP (1, 10 and 100 μg/mL) on the phagocytosis of RAW264.7 cells to EGFP-BL21 was analyzed by flow cytometry, and the secretion of IL-6 and TNF-α was measured by ELISA. **Results** Recombinant *Escherichia coli* EGFP-BL21 with stable expression of EGFP was obtained. After pretreatment with MDMP, the phagocytosis of RAW264.7 cells to EGFP-BL21 was significantly inhibited, and the phagocytic index (PI) of the pretreatment group (10 and 100 μg/mL) was significantly lower than that of the positive control group ($P<0.01$). Furthermore, MDMP (10 and 100 μg/mL) significantly decreased the secretion of TNF-α and IL-6 in EGFP-BL21-stimulated RAW264.7 cells. **Conclusion** MDMP pretreatment can inhibit the phagocytosis of RAW264.7 cells to Gram-negative bacteria, and reduce the secretion of inflammatory factors such as TNF-α and IL-6.

[**Key words**] myeloid differentiation protein-2 mimetic peptide; green fluorescent protein; Gram-negative bacteria; phagocytosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171848) and the Innovation Foundation for Young Scholars of Third Military Medical University (SWH2011023). Corresponding author: Yang Junxia, E-mail: yangjunxia1234@126.com

脓毒症是由严重感染引起的全身炎症反应综合征,是机体受病原刺激后诱发的一种失控性免疫反应[1]。既往研究表明,革兰阴性菌是引发这种高致死性疾病的主要病原分子,其细胞壁上的脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)能激活宿主免疫细胞上的Toll样受体-4(toll like receptor-4,TLR-4)跨膜信号通路,释放炎症介质[2-3]。大量炎症介质的过度释放是导致脓毒症患者多器官功能衰竭甚至死亡的主要原因[4-5]。在调控TLR-4跨膜信号通路的诸多种信号蛋白/受体中,髓样分化蛋白-2(myeloid differentiation protein-2,MD-2)被认为是活化该通路所必需的受体分子,在其中发挥着不可或缺的作用[2,6]。因此,在防治脓毒症研究中,MD-2是一个非常关键的拮抗靶点[6]。我们基于MD-2结构与功能的关系设计构建了1条模拟肽(MD-2 mimetic peptide,MDMP),并经体内外实验证实MDMP能明显抑制LPS诱导的过度炎症反应[7]。但MDMP是否同样能抑制革兰阴性菌感染引起的炎症反应,以及是否影响巨噬细胞对革兰阴性菌的吞噬作用尚不清楚。因此,本实验拟通过构建表达增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)的大肠杆菌EGFP-BL21,观察MDMP对RAW264.7细胞吞噬EGFP-BL21的影响,并探讨该过程中炎症因子TNF-α和IL-6分泌水平的变化,以期进一步阐释MDMP的抗炎作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

模板质粒pEGFP-C3购自Clontech公司;*E. coli* DH5α、表达菌BL21(DE3)PLysS和表达载体pET-32a(+)购自Novagen公司;质粒小样快速提取试剂盒和DNA胶回收试剂盒购自Omega公司;2×PCR Solution Premix PrimeSTAR® HS、100 bp DNA Ladder Marker、λ-*Hin*dⅢ digest DNA标准、限制性内切酶*Hin*dⅢ和*Bam*HⅠ、T_4 DNA连接酶,均购自TaKaRa公司;MDMP由钟鼎生物采用FMOC固相合成法合成;RAW264.7细胞购自上海细胞库;DMEM培养基、胎牛血清均购自Gibco公司;异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自Solarbio公司;氨苄青霉素、4S green核酸染色剂、琼脂糖和PCR引物合成均由上海生工生物工程有限公司提供;TNF-α和IL-6 ELISA试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 EGFP基因的扩增 通过检索GenBank数据库中pEGFP-C3质粒的基因序列,用Primer Premier 5.0软件设计引物扩增EGFP的编码序列。引物上游:5′-GAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCG-3′;下游:5′-CCTAAGCTTCTTGTACAGCTCGTCCA-3′。在上游引物5′端加入*Bam*HⅠ限制性酶切位点和3个保护碱基,下游引物5′端加入*Hin*dⅢ限制性酶切位点和3个保护碱基,拟扩增序列长度为735 bp。取2×PCR Solution Premix PrimeSTAR® HS 25 μL,pEGFP-C3质粒2 μL,上、下游引物(10 nmol/μL)各1.5 μL,最后用20 μL无菌水将反应液总体积调至50 μL,混匀,置PCR仪中进行扩增;反应条件为:94 ℃预变性2 min,94 ℃变性45 s,65 ℃退火30 s,72 ℃延伸45 s,35个循环,再于72 ℃延伸5 min。扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳验证。

1.2.2 原核表达载体pET-32a(+)-EGFP的构建、酶

切鉴定及序列测定　将经 DNA 胶回收试剂盒纯化后的 PCR 产物与 pET-32a(+)载体同时用 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ进行双酶切,对酶切产物进行纯化,T_4 DNA 连接酶 16 ℃反应过夜,即得到 pET-32a(+)-EGFP 重组质粒。然后以热休克法将重组质粒转化至感受态 *E. coli* DH5α 中,用含氨苄青霉素的 LB 平板筛选出阳性克隆,扩增后提取质粒,PCR 进行鉴定并将产物送往上海 Invitrogen 公司测序。

另以空白质粒 pET-32a(+)为对照,用限制性内切酶 *Bam*HⅠ对重组质粒 pET-32a(+)-EGFP 进行酶切鉴定,酶切反应体系为 20 μL,反应时间为 3 h,然后经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳观察酶切结果。

1.2.3　EGFP 基因的原核表达和检测　将测序正确的 pET-32a(+)-EGFP 质粒转化至感受态 *E. coli* BL21(DE3)PLysS 中,用含氨苄青霉素的平板筛选阳性克隆,接种到 LB 液体培养基中扩大培养,培养 2 h 后加入 IPTG(1.0 mmol/L)进行诱导,再培养 10 h 后收获细菌。提前在 6 孔板中接种 5×10^5/孔 RAW264.7 细胞,过夜培养后以不含血清的 DMEM 培养基饥饿细胞 2 h。另外,取 1 mL 菌液于 5 000 r/min 离心 5 min,沉淀以灭菌 PBS 洗涤 2 遍后用含 2% 胎牛血清(FBS)在 37 ℃水浴中调理 30 min 备用。最后,以加入空白菌 BL21(DE3)PLysS 作为对照,实验组中加入感染复数(multiplicity of infection,MOI)=50 调理过的重组菌液,用激光共聚焦观察吞噬 10、20 min 和 30 min 后细胞中的绿色荧光的变化情况,流式细胞术检测吞噬的荧光强度和阳性细胞比率。

1.2.4　流式细胞术检测 MDMP 对 RAW264.7 细胞吞噬革兰阴性菌的影响　在 6 孔板中接种 5×10^5/孔 RAW264.7 细胞,过夜培养后以 DMEM 培养基换液;根据 MDMP 浓度将实验分为 0(阳性对照)、1.0、10、100 μg/mL 4 组,再加上空白组(不加细菌)共 5 组。提前将革兰阴性菌(MOI=50)与 MDMP 于 37 ℃预孵育 30 min 后以 2% FBS 调理,加入 6 孔板中,空白组加入相同体积的 PBS;37 ℃,5% CO_2 孵箱中吞噬 30 min 后以 PBS 洗去未吞噬细菌,胰酶消化后 1 000 r/min 离心 5 min,去上清,细胞重悬于 200 μL PBS 中上机检测。以吞噬系数(phagocytic index,PI)评价 MDMP 对巨噬细胞吞噬革兰阴性菌的影响。PI=阳性细胞百分比×平均荧光强度。

1.2.5　MDMP 对革兰阴性菌诱导的炎症反应的影响　接种 5×10^5/孔 RAW264.7 细胞于 6 孔板中过夜培养,换上不含 FBS 的 DMEM 培养基。提前将革兰阴性菌(MOI=50)与 MDMP 于 37 ℃共孵育 30 min 后以 2% FBS 调理,加入至 RAW264.7 细胞培养的 6 孔板中,空白孔加入相同体积的 PBS;37 ℃,5% CO_2 孵箱中培养 12 h 后收取培养上清液,以 ELISA 试剂盒分别检测上清液中 TNF-α 和 IL-6 的表达水平。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 6 软件进行 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　EGFP 基因片段的扩增

电泳检测结果显示,经 PCR 成功扩增出单一的大小 700~800 bp 的产物(图 1A),与预计产物的大小 735 bp 一致,此说明目的条带得到了成功的扩增。

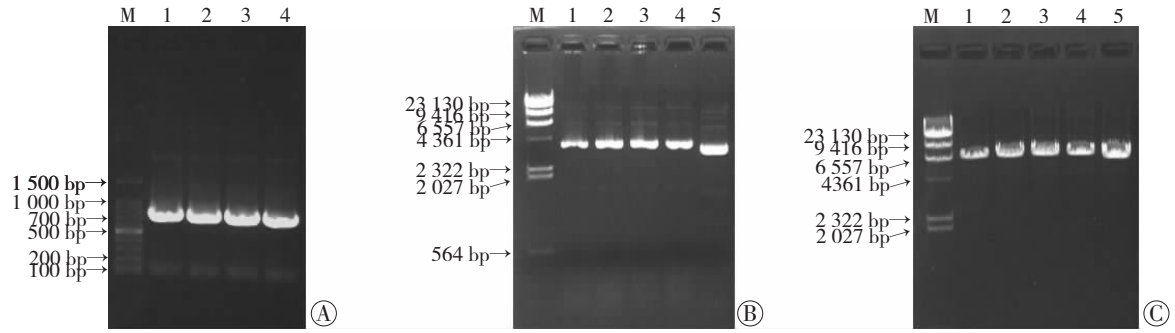
2.2　重组质粒 pET-32a(+)-EGFP 的构建

将双酶切后 pET-32a(+)质粒和 EGFP 的 PCR 产物经连接酶连接后,对阳性克隆进行 PCR 检验。以 pET-32a(+)空白质粒作为阴性对照,结果见图 1B。pET-32a(+)-EGFP 重组质粒条带明显比 pET-32a(+)空白质粒要大,与理论相符,可初步确定重组质粒构建成功。另外,酶切鉴定结果表明,pET-32a(+)-EGFP 重组质粒单酶切产物条带大小一致且均较单酶切后的 pET-32a(+)空白质粒要大,提示重组质粒应为阳性质粒(图 1C)。

进一步将重组质粒回收、提纯,送往上海 Invitrogen 公司测序,测序结果显示重组质粒中插入的序列与 pEGFP-C3 质粒中 EGFP 蛋白的编码序列完全一致,且读码框也相同,故 pET-32a(+)-EGFP 原核表达载体构建成功。

2.3　流式细胞术和激光共聚焦检测 EGFP 的原核表达

重组质粒 pET-32a(+)-EGFP 成功构建并不意味着 EGFP 就能够在原核系统中得到高表达,通过利用热休克法将质粒 pET-32a(+)-EGFP 转化感受态 *E. coli* BL21(DE3)PLysS,以流式细胞术和共聚焦分别检测 RAW264.7 细胞吞噬转化菌后的荧光强度,即可反映 EGFP 的表达量。共聚焦检测结果显示对照组未见绿色荧光,而实验组随着吞噬时间的增加,胞浆内可明显观察到绿色荧光逐渐增多(图 2)。这说明 EGFP 的原核表达是成功的,而且通过 IPTG 诱导后能够得到 EGFP 的高表达,从而证明该表达菌可很好地用于示踪和定量。流式细胞术检测结果见图 3,实验组荧光强度明显高于阳性对照组,进一步证明该细菌中 EGFP 得到了很好的表达,该细菌可作为可视化工具用于后续实验。



A:PCR 反应扩增出的 EGFP 基因片段电泳结果 1~4:目的基因序列;M:100 bp DNA 梯度标准;B:重组质粒 pET-32a(+)-EGFP 的电泳结果 1~4:pET-32a(+)-EGFP 重组质粒;5:pET-32a(+)空白质粒;M:酶切标准;C:重组质粒 pET-32a(+)-EGFP 的酶切鉴定 1~4:pET-32a(+)-EGFP 重组质粒单酶切产物;5:pET-32a(+)空白质粒单酶切产物;M:酶切标准

图 1 重组质粒的构建与鉴定

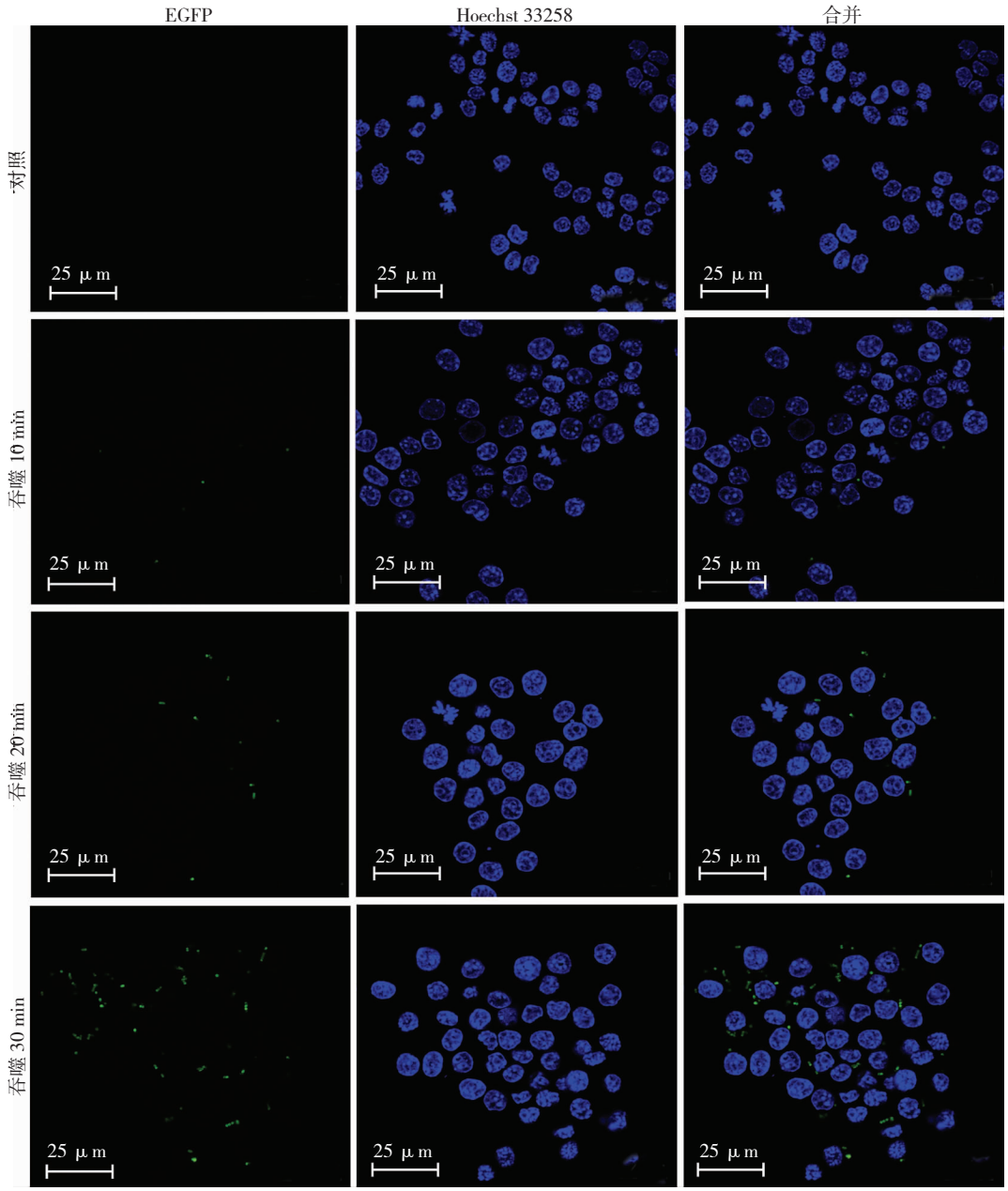
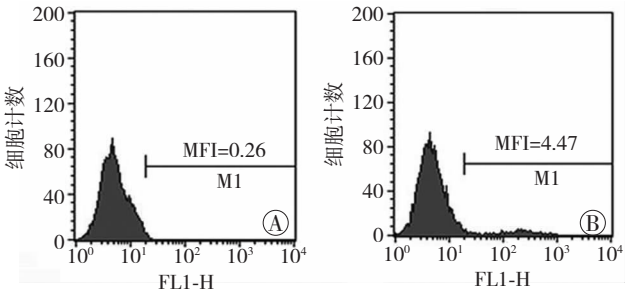


图 2 激光共聚焦检测 RAW264.7 细胞对荧光细菌的吞噬

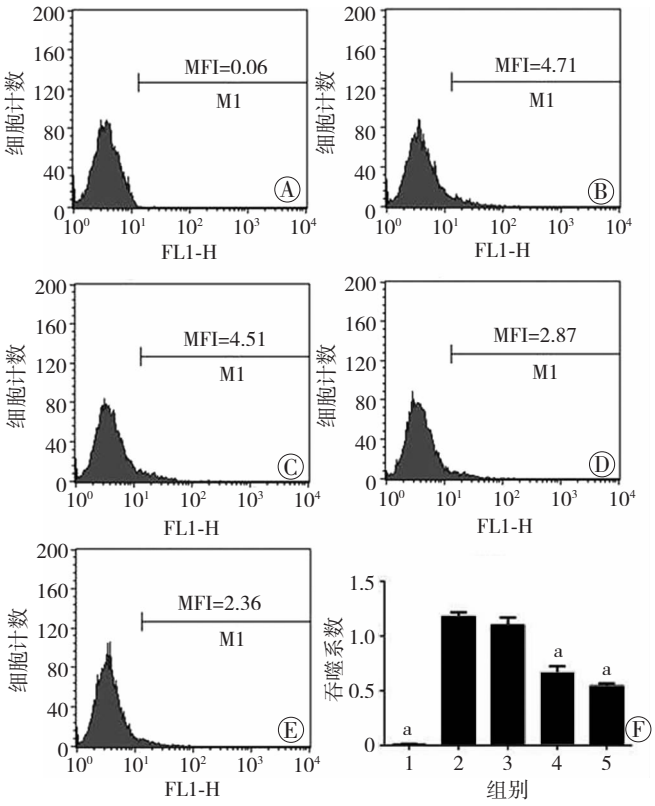


A:阳性对照组;B:实验组

图3　流式细胞术检测 RAW264.7 细胞对荧光细菌的吞噬

2.4　MDMP 对 RAW264.7 细胞吞噬革兰阴性菌的影响

通过流式细胞术检测各组细胞中 EGFP 的荧光强度,以反映细胞吞噬革兰阴性菌的量。与空白组比较,用 EGFP-BL21 刺激的阳性对照组中 EGFP 的阳性细胞比率明显上升。与阳性对照组比较,预处理组随 MDMP 浓度的升高(1.0~100 μg/mL),EGFP 的阳性细胞比率依次降低(图4)。阳性对照组 PI 值显著高于空白组($P<0.01$);10、100 μg/mL MDMP 组 PI 值显著低于阳性对照组($P<0.01$),且呈剂量依赖效应。因此,MDMP 可抑制 RAW264.7 细胞对革兰阴性菌的吞噬作用。

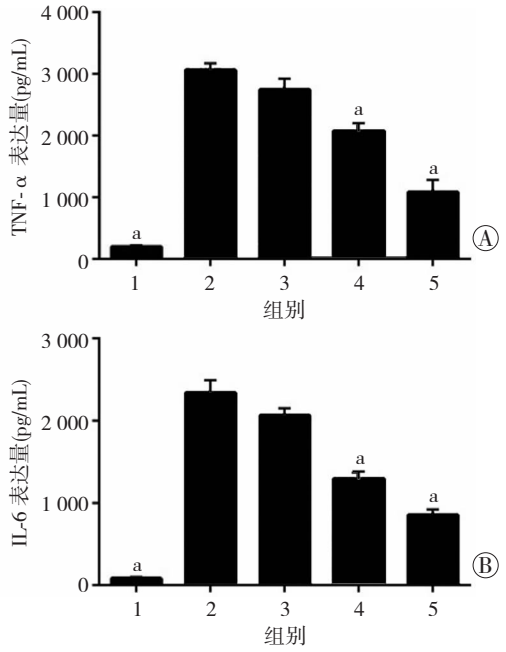


A:空白组;B:阳性对照组;C:1.0 μg/mL MDMP 组;D:10 μg/mL MDMP 组;E:100 μg/mL MDMP 组;F:各组吞噬系数比较　1:空白组;2:阳性对照组;3:1.0 μg/mL MDMP 组;4:10 μg/mL MDMP 组;5:100 μg/mL MDMP 组　a:$P<0.01$,与阳性对照组比较

图4　MDMP 对 RAW264.7 细胞吞噬革兰阴性菌的影响

2.5　MDMP 对革兰阴性菌诱导 RAW264.7 细胞分泌 TNF-α 及 IL-6 的影响

如图5所示,与空白组比较,用 EGFP-BL21 诱导的阳性对照组中 TNF-α 和 IL-6 表达量显著上升($P<0.01$);与阳性对照组比较,10、100 μg/mL MDMP 组 TNF-α 和 IL-6 分泌水平显著降低($P<0.01$),表明 MDMP 可明显抑制 RAW264.7 细胞促炎因子的表达。



1:空白组;2:阳性对照组;3:1.0 μg/mL MDMP 组;4:10 μg/mL MDMP 组;5:100 μg/mL MDMP 组　a:$P<0.01$,与阳性对照组比较

图5　MDMP 抑制革兰阴性菌诱导的 TNF-α(A)及 IL-6(B)的分泌

3　讨论

革兰阴性菌是引起人类感染性疾病的主要病原之一,在感染性疾病的病原构成中占有重要的地位。其细胞壁上的 LPS 可与体内巨噬细胞表面 MD-2 结合,然后募集 TLR-4 二聚化,形成受体复合体,激活 LPS 信号转导通路,进而引起炎症介质的释放,诱发炎症反应[2-4]。该过程是革兰阴性菌感染造成炎性疾病的基本途径。过度促炎症介质释放可引起全身炎症反应综合征,即脓毒症[8]。所以,早期干预革兰阴性菌与巨噬细胞的相互作用是抗脓毒症的有效途径之一。

MDMP 是我们模拟 MD-2 结构上与 LPS 及 TLR-4 结合区域的氨基酸序列而合成的一个短肽。前期的研究表明,MDMP 能明显地抑制 LPS 诱导的过度炎症反应,并有效地降低脓毒症模型小鼠的死亡率[7]。但

MDMP 在完整革兰阴性菌感染引起的炎症反应的作用尚不清楚。为此,本实验以 RAW264.7 细胞为研究对象,利用革兰阴性菌刺激建立体外细胞炎症模型,观察 MDMP 对革兰阴性菌诱导的炎症反应的抑制作用。本研究结果显示,不同浓度的 MDMP 对革兰阴性菌活化的巨噬细胞分泌 TNF-α 和 IL-6 具有明显的抑制作用,且呈剂量依赖效应,表明 MDMP 可抑制革兰阴性菌感染引起的炎症反应。

由于 MDMP 源于 MD-2,其结构中包含有 MD-2 分子上与 LPS 结合的氨基酸序列。我们推测,在 MDMP 与革兰氏阴性细菌预孵育过程中,该序列由于空间位阻小,可能更易与细菌胞壁上的 LPS 结合,从而阻断了细菌经 MD-2/TLR-4 信号通路被巨噬细胞吞噬,进而抑制炎症因子的分泌。为了证实这一假设,我们拟进一步检测 MDMP 是否对巨噬细胞吞噬革兰阴性菌有影响。

众所周知,吞噬是细胞进化出的一个内化固体颗粒和溶质的功能,是天然免疫的一个重要部分。作为链接天然免疫和适应性免疫的重要免疫机制,细胞吞噬对病原清除和保护机体免受异物侵害具有重要作用[9]。MD-2 和 TLR-4 是介导革兰阴性菌内化吞噬必不可少的成分[10-11]。常规的评价免疫细胞吞噬作用的一个重要指标是检测其对细菌的吞噬率,传统的方法采用对吞噬细菌的巨噬细胞涂片染色后在显微镜下观察的方法进行[12]。但由于该方法操作繁琐,且因细菌形态较小,染色后显微镜下观察、计数很困难[13]。

基于此,我们首先通过克隆稳定表达 EGFP 的革兰阴性菌 EGFP-BL21,作为可视化工具观察 MDMP 对巨噬细胞吞噬革兰阴性菌的影响。然后采用流式细胞术检测各实验组 RAW264.7 细胞中 EGFP 的荧光强度,结果显示,MDMP 预处理组的吞噬系数明显低于阳性对照组($P<0.01$),且随 MDMP 浓度增加依次降低。这表明 MDMP 可抑制 RAW264.7 细胞对革兰氏阴性细菌的吞噬作用,证实了前述推测。

综上所述,本研究通过构建稳定表达 EGFP 的革兰阴性菌 EGFP-BL21,以其作为研究工具,证明了 MDMP 可明显抑制巨噬细胞对革兰阴性菌的吞噬作用,并降低该过程中炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的分泌。本实验结果进一步阐明了 MDMP 的抗炎作用机制,为抗炎多肽的研制奠定了理论基础。

参考文献:

[1] de-Jong H K, van-der-Poll T, Wiersinga W J. The systemic pro-inflammatory response in sepsis[J]. J Innate Immun, 2010, 2(5): 422-430. DOI: 10.1159/000316286

[2] Park B S, Song D H, Kim H M, *et al*. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex [J]. Nature, 2009, 458(7242): 1191-1195. DOI: 10.1038/nature07830

[3] 梁华平, 姚咏明, 王正国. 创伤后脓毒症的治疗现状不容乐观——预警研究值得重视[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(21): 2223-2226. DOI: 10.16016/ j.1000-5404.2011.21.041

[4] Duan G, Zhu J, Xu J, *et al*. Targeting myeloid differentiation 2 for treatment of sepsis[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2014, 19: 904-915.

[5] Bassetti M, Righi E. New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of gram-negative bacterial infections[J]. Curr Opin Crit Care, 2015, 21(5): 402-411. DOI: 10.1097/MCC.0000000000000235

[6] Park S H, Kim N D, Jung J K, *et al*. Myeloid differentiation 2 as a therapeutic target of inflammatory disorders[J]. Pharmacol Ther, 2012, 133(3): 291-298. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.11.001

[7] Duan G J, Zhu J, Wan J Y, *et al*. A synthetic MD-2 mimetic peptide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses *in vivo* and *in vitro*[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(9): 1091-1100. DOI: 10.1016/j.intimp.2010.06.010

[8] Annane D, Bellissant E, Cavaillon J M. Septic shock[J]. Lancet, 2010, 365(9453): 63-78.

[9] Aderem A, Underhill D M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages[J]. Annu Rev Immunol, 1999, 17: 593-623.

[10] Jain V, Halle A, Halmen K A, *et al*. Phagocytosis and intracellular killing of MD-2 opsonized gram-negative bacteria depend on TLR4 signaling[J]. Blood, 2008, 111(9): 4637-4645. DOI: 10.1182/blood-2007-11-126862

[11] Tissieres P, Pugin J. The role of MD-2 in the opsonophagocytosis of Gram-negative bacteria[J]. Curr Opin Infect Dis, 2009, 22(3): 286-291. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32832ae2fc

[12] 曹雪涛. 免疫学技术及其应用[M]. 北京:科学出版社, 2010: 15-16.

[13] White-Owen C, Alexander J W, Sramkoski R M, *et al*. Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(8): 2071-2076.

(**收稿**:2015-10-12;**修回**:2015-11-14)

(编辑 汪勤俭)