

[文章编号] 1000-2200(2010)06-0541-05

· 基础医学 ·

流式细胞术检测中性粒细胞产生活性氧方法学探讨

蔡 辉,姜丽娜,李柏青

[摘要]目的:建立用流式细胞术检测人外周血中性粒细胞(polymorphonuclear cells, PMN)产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)的方法。方法:健康人外周全血或用 Percoll 分离的 PMN,加探荧光剂双氢罗丹明 123(DHR123)或 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)作用 15 min,再加佛波醇酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)于 37℃作用 5~90 min后,用流式细胞仪检测 PMN 内的罗丹明 123(rhodamine 123, RHO)或氧化型二氯荧光素(dichlorofluorescein, DCF)的荧光强度,以反映 PMN 内 ROS 产生的水平。结果:以 DHR123 为荧光探针时,PMA 刺激全血或分离 PMN 产生 ROS 的时间动力学相似,在 37℃作用 5~60 min ROS 量呈递增趋势,且在 60 min 左右达到峰值,60~90 min 时渐下降。以 DCFH-DA 为荧光探针时,PMA 刺激全血 PMN 产生 ROS,在 37℃作用 5 min 时反应生成 ROS 量达到峰值,随后出现明显递减趋势,而 PMA 刺激分离 PMN 产生 ROS 在 5~30 min 逐渐增高并在 60~90 min 达平台期。实验中还发现甲醛试剂可以降低 RHO 的荧光强度。结论:采用流式细胞术检测 PMN 产生 ROS 是一种简便、可靠、稳定的方法。

[关键词] 中性粒细胞;流式细胞术;活性氧;双氢罗丹明 123;2',7'-二氯荧光素二乙酸酯

[中国图书资料分类法分类号] R 329.24 **[文献标识码]** A

A methodology for detection of reactive oxygen species of neutrophils by flow cytometry

CAI Hui, JIANG Li-na, LI Bai-qing

(Department of Immunology, Bengbu Medical College; Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for detection of reactive oxygen species(ROS) of human polymorphonuclear cells(PMN) by flow cytometry. **Methods:** The whole fresh peripheral blood or Percoll separated PMN were incubated with dihydrogenrhodamine 123(DHR123) or 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA) as fluorescence probes for 15 min, followed adding PMA for 5-90 minutes at 37℃. The fluorescence intensities of rhodamine 123 and dichlorofluorescein were detected by flow cytometry, which reflecting the amount of reactive oxygen species within PMN. **Results:** By using DHR123 as a fluorescence probe, the tendency of the production of ROS generated in whole blood or separated PMN was similar when PMA incubated with them at 37℃, the amount of ROS were increased from 5 min to 60 min, reached a peak at 60 min, and decreased between 60 min to 90 min. By using DCFH-DA as fluorescent probe, the amount of ROS generated in whole blood stimulated by PMA reached the maximum in 5 min and thereafter decreased rapidly, whereas the production of ROS generated by isolated PMN increased depended on the time from 5 min to 30 min and reached platform between 60 min to 90 min; the RHO fluorescence intensity was apparently inhibited by formaldehyde-containing reagents. **Conclusions:** The application of flow cytometry to measure the reactive oxygen species within the neutrophils is simple, reliable and stable method.

[Key words] polymorphonuclear cells; reactive oxygen species; flow cytometry; dihydrogenrhodamine 123; 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

在机体感染早期,外周血中性粒细胞(polymorphonuclear cells, PMN)从血管中游出,首先到达炎症部位,是机体天然免疫系统抵御病原微生物感染的重要屏障。PMN 抑菌杀菌作用与呼吸爆发时胞内还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶介导产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)有关^[1]。NADPH 氧化酶的主要功能是从 NADPH 中获得一个电子生产超氧阴离子

(O_2^-), O_2^- 是所有 ROS 分子的前身。体内大多数的 O_2^- 经超氧歧化酶(SOD)的作用转变成过氧化氢(H_2O_2)。PMN 内的 H_2O_2 经吞噬小体髓过氧化物酶(MPO)的作用生成次氯酸(HOCl)和氯胺^[2]。研究^[3]发现,遗传缺陷的慢性肉芽肿疾病(CGD)患者 PMN 的 NADPH 氧化酶功能缺欠,PMN 不能够产生呼吸爆发,导致反复感染。检测 PMN 的呼吸爆发后 ROS 的产生,通常有分光光度仪法、化学发光法和电子自旋共振法等。也有用特异性的荧光探针在流式细胞术检测 PMN 的呼吸爆发,然而目前尚未见用流式细胞术同时检测全血和分离 PMN 呼吸爆发的报道。本实验用两种探针同时检测全血和分离 PMN 样本的 ROS,探讨流式细胞术检测细胞内 ROS 的方法。

[收稿日期] 2010-03-05

[基金项目] 国家科技重大专项基金资助项目(2008ZX10003-011)

[作者单位] 蚌埠医学院 免疫学教研室,安徽省感染与免疫重点实验室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 蔡 辉(1976-),男,硕士研究生。

[通讯作者] 李柏青,博士,研究生导师,教授。E-mail: baiqingli@bbmc.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 试剂、细胞和仪器 双氢罗丹明 123 (dihydrogenrhodamine 123, DHR123)、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)、佛波醇酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 和二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自 Sigma 公司; RPMI 1640 购自 GIBCO 公司; Percoll 原液购自 Pharmacia 公司; 本实验所用的人外周血均来自本院健康教工和学生; 流式细胞仪 FACS Calibur 为美国 Becton Dickinson 公司产品。

1.2 PMN 的分离 参照 Haslett 法^[4-5], 本实验有所改进。将新鲜采集的健康志愿者外周静脉血经 1 500 r/min 水平离心 5 min 后, 取红细胞上的“白膜”层, 用 RPMI 1640 稀释为富含 PMN 细胞悬液, 继在玻璃离心试管中, 依次加入 75%、60% Percoll 液和富含 PMN 细胞悬液, 三者体积比为 2:2:1, 然后以 2 000 r/min 水平离心 20 min, 吸取 60% 与 75% Percoll 液的界面层中 PMN。用完全 RPMI 1640 充分洗脱 Percoll 胶粒, 用低渗法将残余的红细胞裂解, PMN 经洗涤后, 活性与纯度均 > 96%, 用完全 1640 制成 1×10^6 /ml 细胞悬液。

1.3 PMA 刺激全血 PMN 生成 ROS 的检测 取健康人抗凝外周血, 分别与终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ DHR123 和 $10 \mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 混合, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴箱中孵育 15 min 后取出, 置于冰盒中 5 min。随后向管中加入终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ PMA。充分混匀后于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 5~90 min, NH_4Cl 溶血 15 min, 离心洗涤弃上清, PBS (pH 7.4) 重悬。用流式细胞仪检测 PMN 产生 ROS 时, 用空白对照管在 FSC 和 SSC 二维点阵图选取 PMN 区域。以 FL1 (RHO) 直方图检测 RHO 阳性的 PMN 为产生 ROS 的 PMN; 以 FL1 (DCF) 直方图检测 DCF 阳性的 PMN 为产生 ROS 的 PMN。每个样品收集 1×10^4 个细胞, Cell Quest 软件分析平均荧光强度 (MFI)。

$$\text{PMN 活化率} = \frac{\text{产 ROS 细胞 (RHO 阳性细胞或者 DCF 阳性细胞)}}{\text{总细胞}} \times 100\%$$

$$\text{PMN 产生 ROS 量} = \text{PMN 活化率} \times \text{MFI}$$

1.4 PMA 刺激用 Percoll 分离 PMN 生成 ROS 的检测 取经 Percoll 分离后的 PMN 分别与终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ DHR123 和 $10 \mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 相混合, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴箱中孵育 15 min, 随后向管中加入终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ PMA。充分混匀后于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 0~90 min, 用流式细胞仪检测 PMN 产生 ROS 时, 用空白对照管在 FSC 和 SSC 二维点阵图选取 PMN 区域。以 FL1 (RHO) 直方图检测 RHO 阳性的 PMN 为

产生 ROS 的 PMN; 以 FL1 (DCF) 直方图检测 DCF 阳性的 PMN 为产生。每个样品收集 1×10^4 个细胞, Cell Quest 软件分析 MFI。计算 PMN 活化率以及计算活化 PMN 产生 ROS 量参考上述公式。

1.5 含有甲醛的固定剂对 PMA 刺激全血 PMN 生成 ROS 的检测 取健康人抗凝外周血, 与终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ DHR123 混合, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴箱中孵育 15 min 后取出, 置于冰盒中 5 min。随后向管中加入终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ PMA。充分混匀后于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 0~90 min, NH_4Cl 溶血 15 min, 离心洗涤弃上清, 分别用 PBS (pH 7.4)、1% 甲醛、1% 多聚甲醛 (PFA) 重悬, 用流式细胞仪进行检测。用空白对照管在 FSC 和 SSC 二维点阵图选取 PMN 区域。以 FL1 (RHO) 直方图检测 RHO 阳性的 PMN 为产生 ROS 的 PMN, 每个样品收集 1×10^4 个细胞, Cell Quest 软件分析 MFI。计算 PMN 活化率以及计算活化 PMN 产生 ROS 量参考上述公式。

1.6 统计学方法 采用单因素方差分析及 LSD 检验与 *t* 检验。

2 结果

2.1 DHR123 为荧光探针 PMA 刺激 PMN 产生 ROS 的动力学 PMA 与全血在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用 5、15、30、60 和 90 min, PMN 生成 ROS 量分别 101.40、282.96、636.23、805.30 和 561.39; PMA 与分离 PMN 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用 5、15、30、60 和 90 min, 生成 ROS 量分别为 148.48、678.64、1 577.48、3 009.68 和 828.37。两者在 5~60 min ROS 量呈递增趋势且在 60 min 左右达到峰值, 60~90 min 时渐下降 (见表 1、图 1)。

表 1 DHR123 为荧光探针 PMA 刺激全血和分离 PMN 生成 ROS 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间 (min)	全血 PMN (n=7)	分离 PMN (n=8)
0	1.42 ± 1.17	6.69 ± 4.25
5	101.40 ± 16.85	148.48 ± 92.94
15	282.96 ± 32.31 **	678.64 ± 198.79
30	636.23 ± 158.48 **	1 577.48 ± 535.20 **
60	805.30 ± 220.99 **	3 009.68 ± 1 699.68 **
90	561.39 ± 267.59 **	828.37 ± 438.93 *
F	29.04	17.44
P	<0.01	<0.01
MS _{组内}	24 481.021	42 569 364.001

q 检验: 与 0 min 比较 ** *P* < 0.01

2.2 DCFH-DA 为荧光探针 PMA 刺激 PMN 产生 ROS 的动力学 PMA 与全血在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用 5、15、30、

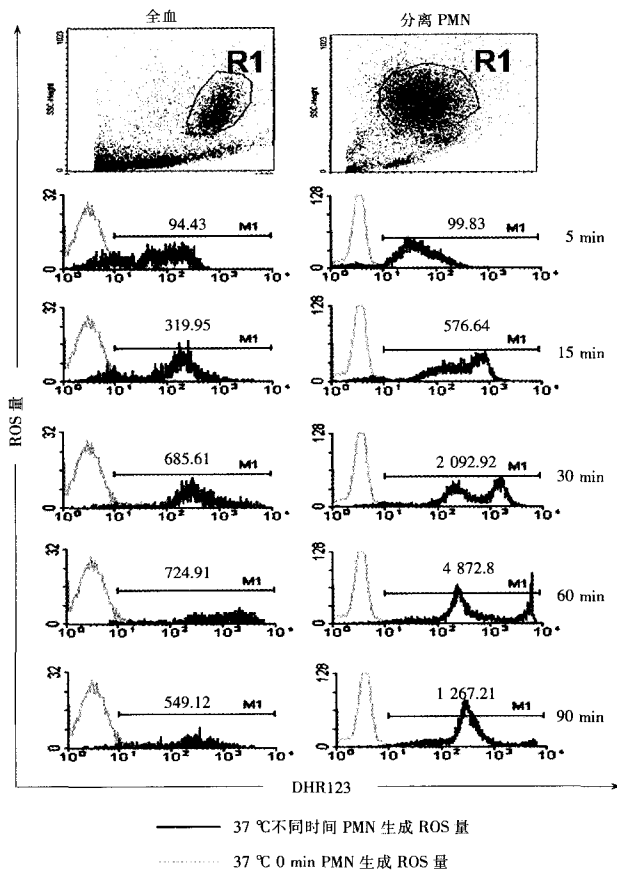


图 1 DHR123 为荧光探针 PMA 刺激全血或分离 PMN 不同时间生成 ROS 流式分析

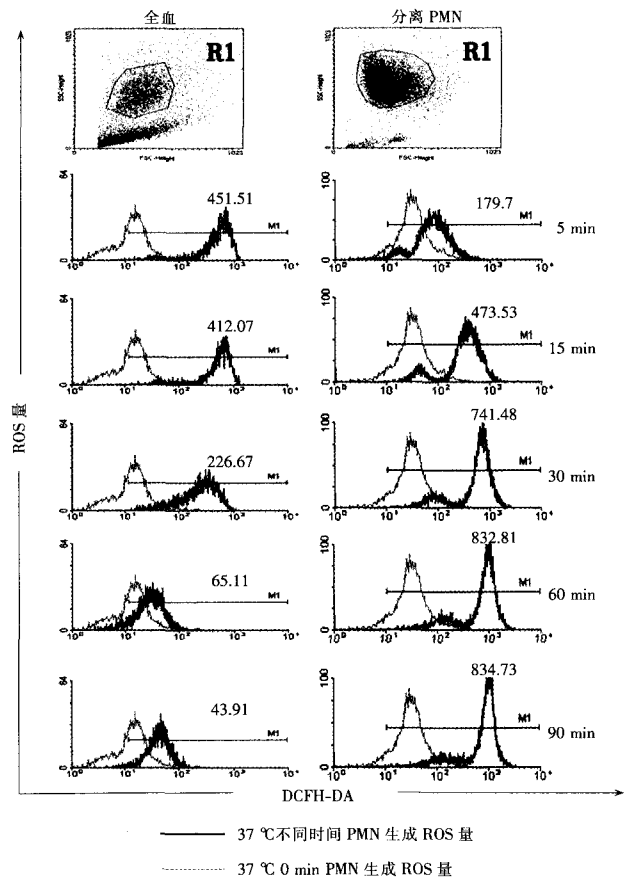


图 2 DCFH-DA 为荧光探针 PMA 刺激全血或分离 PMN 不同时间生成 ROS 流式分析

60 和 90 min, PMN 生成 ROS 量分别为 499.09、307.31、219.15、83.93 和 56.05; PMA 与分离 PMN 在 37 °C 作用 5、15、30、60 和 90 min, 生成 ROS 量分别为 150.39、491.49、851.15、940.45 和 924.25。在 DCFH-全血法中, PMA 与 PMN 在 37 °C 作用 5 min 后, 反应生成 ROS 量达到峰值, 随后就出现递减趋势; 在 DCFH-分离法中, 生成 ROS 量从 0 ~ 30 min 逐渐递增, 60 ~ 90 min 时达到平台期(见表 2、图 2)。

表 2 DCFH-DA 为荧光探针 PMA 刺激全血或分离 PMN 生成 ROS 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间 (min)	全血 PMN (n=9)	分离 PMN (n=7)
0	23.76 ± 7.49	44.35 ± 17.67
5	499.09 ± 180.41 **	150.39 ± 67.82
15	307.31 ± 191.58 **	491.49 ± 188.04 **
30	219.15 ± 144.47 **	851.15 ± 282.35 **
60	83.93 ± 77.85	940.45 ± 267.48 **
90	56.05 ± 26.19	924.25 ± 280.25 **
F	18.56	24.89
P	<0.01	<0.01
MS _{组内}	16 152.664	45 012.767

q 检验: 与 0 min 比较 * * P < 0.01

2.3 含甲醛的试剂可降低 RHO 的荧光强度 以 DHR123 为荧光探针时, PMA 刺激全血标本 PMN 产生 ROS, 在 5 ~ 90 min 各个时间段, 经溶血洗涤后, 分别用 1% 甲醛和 1% PFA 重悬细胞与用 PBS 重悬细胞比较 MFI, 在各个时间段含有甲醛的试剂均可下调 RHO 的荧光强度, 如 RHO 达到峰值时, 经 PBS 重悬时胞内 MFI 为 748.91, 经 1% 甲醛和 1% PFA 重悬后 MFI 分别为 307.21、404.94, PBS 组与含甲醛试剂组之间的 MFI 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) (见表 3)。

3 讨论

PMN 是人体抵御外来微生物入侵的第一道防线, 是固有性免疫系统中重要的效应细胞。其吞噬病原体的过程包括趋化、黏附、内吞、氧依赖性杀伤和氧非依赖性杀伤等。其中, PMN 胞内富有的 NADPH 氧化酶可催化氧分子接受电子而转变为 ROS, 用以杀灭微生物及外来异物, 同时耗氧量显著增加, 这一现象称为呼吸爆发, 呼吸爆发是 PMN 杀伤病原微生物的关键环节^[6]。

目前检测 ROS 的其他方法有分光光度仪法、化

表3 含有甲醛的试剂对PMA刺激PMN生成ROS量的影响($n_i = 5; \bar{x} \pm s$)

重悬剂	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min
PBS	103.40 ± 19.61	272.49 ± 32.86	586.79 ± 98.10	748.91 ± 116.96	571.53 ± 140.38
1% 甲醛	41.47 ± 9.28 **	125.54 ± 33.09 **	199.24 ± 41.93 **	307.21 ± 203.06 **	144.77 ± 53.42 **
1% PFA	53.88 ± 22.94 **	133.07 ± 51.71 **	225.53 ± 104.02 **	404.94 ± 202.75 *	262.50 ± 125.01 *
F	16.15	21.19	31.69	7.70	19.08
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	332.305	1 616.217	7 399.938	36 099.036	12 728.679

q 检验:与PBS重悬组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

学发光法和电子自旋共振法等。但这些方法存在着重复性较差、效率低、准确性差、操作复杂等优点。流式细胞术是在单个细胞水平上检测ROS,该方法检测灵敏、准确、快速、高效,并减少了实验过程中人为主观因素的影响。本研究在参考文献的基础上经过多次实验,建立了流式细胞术检测全血和分离PMN产生ROS的实验方法。选用DHR-123和DCFH-DA为ROS捕获剂,这两种捕获剂本身应该没有荧光或只有很弱的荧光,它们被氧化后能发出较强的荧光:DHR123可自由进出细胞膜,进入细胞后可被ROS氧化为可发出荧光的RHO,被泵入线粒体内,从而维系在细胞内,经过一定时间的累积,即可通过流式细胞仪检出相应的荧光;DCFH-DA可扩散通过线粒体膜,在线粒体内被酯酶水解,形成无荧光的DCFH,后者对ROS敏感,可迅速被氧化成为具有高荧光的物质——DCF,DCFH可被多种ROS的成分氧化形成DCF,DCF的荧光强度可以反映线粒体内ROS总体状况。

本次实验使用PMA与全血或分离PMN作用后,RHO和DCF的荧光强度增加。PMA是通过增强蛋白激酶C的作用活化NADPH氧化酶从而刺激PMN生成ROS,相关报道^[7-8]显示这两种荧光探针能够敏感检测PMN内的ROS。实验发现,用DHR123为荧光探针,不论PMA刺激的是采用全血法还是分离法获取的PMN,其产生ROS的时间动力学均相似:PMA与全血在37℃作用5、15、30、60和90min,PMN生成ROS量分别为101.40、282.96、633.23、805.32和561.39;PMA与分离PMN在37℃作用5、15、30、60和90min,生成ROS量分别为148.48、678.64、1 577.48、3 009.68和828.37。两者在5~60min ROS量呈递增趋势且在60min左右达到峰值,60~90min时渐下降。60min时分离PMN产生ROS量远高于全血PMN产生ROS量。用DCFH为荧光探针,PMA与全血在37℃作用5、15、30、60和90min,PMN生成ROS量分别为499.09、307.31、219.15、83.93和56.05;PMA与分离PMN在37℃作用5、15、30、60和90min,生成ROS量分别为150.39、

491.49、851.15、940.45和924.25。在DCFH-分离法中,生成ROS量从0~30min逐渐递增,30min后达到平台期;在DCFH-全血法中,PMA与PMN在37℃作用5min后,反应生成ROS量达到峰值,随后就出现递减趋势。有研究^[9-10]表明,PMN内H₂O₂氧化DCFH并非是直接反应,而是依赖于过氧化物酶的活化,当胞内过氧化物酶水平改变时,DCF荧光强度就不能反映ROS的水平。我们认为,DCFH在检测全血和分离PMN中ROS的时间动力学存在差异,可能是因为在分离PMN的过程中影响到胞内过氧化物酶的活性而造成的。还有研究^[11-12]证实,DHR检测ROS产物比DCFH更为灵敏。本实验中使用PMA的终浓度为1μmol/L,与国外其他研究^[13]报道一致,低浓度的PMA不能完全刺激PMN的活化。另外所使用的PMA工作液4℃储存应少于2周,否则PMA的活性会降低,不能完全刺激PMN的活化。在采用PMA刺激全血时,在流式细胞仪上会出现PMN群偏移的现象,因此适度地调整选取PMN区域的位置,有利于数据的精确性。

实验发现保持PMN的活性和膜的完整性,对检测其生成ROS的准确性至关重要。国外有文献^[14]报道,在全血状态下用DCFH-DA检测PMA此刺激PMN生成ROS时,不同的溶血剂对DCFH检测PMN生成ROS量有影响——含有甲醛的溶血剂可以破坏细胞膜的完整性,使荧光染料DCFH流出胞体,从而使胞内的荧光强度下降。本次实验中,用DHR检测PMA刺激全血PMN呼吸爆发时,使用能够保持细胞活性的氯化铵溶血剂,在重悬细胞的时候使用含有甲醛的固定剂,结果发现同样有荧光下降的现象。

综上所述,流式细胞术检测PMN产生ROS是一种简便、快速和重复性好的方法。用于检测和评估PMN对异物的非特异性吞噬和氧化功能都有重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils [J]. J Immunol Methods, 1999, 232(1/2): 3-14.

(下转第547页)

生长和分化都有调节作用。某些急性炎症、自身免疫性疾病、淋巴细胞恶性肿瘤(如多发性骨髓瘤)等与患者体内 IL-6 水平异常增高有关,在很多慢性炎症性疾病的发病机制中有很重要的作用^[11]。鉴于 IL-23 复杂的生物学功能,其在抗感染免疫、抗肿瘤免疫以及自身免疫病的发病中发挥着重要作用,因此,成功克隆表达 IL-23 基因,获取高生物学活性的重组 IL-23,对于进一步研究 IL-23 的生物学功能,探讨其在抗感染免疫、抗肿瘤免疫以及自身免疫病中的作用有重要的意义。

目前,小鼠 IL-23 的克隆表达及转基因细胞的构建已有较多报道,而对于人 IL-23 的克隆表达则研究较少,目前国内尚未见相关报道。鉴于 IL-23 拥有与 IL-12 相同的 p40 亚基,而 IL-12 的 p40 亚基基因已克隆表达,因此成功克隆表达 IL-23 的关键在于 p19 亚基基因的成功克隆。IL-23 主要来源于活化的单核/巨噬细胞和 B 细胞,IL-23 p19 的 mRNA 主要在内皮细胞和造血细胞表达,包括 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突状细胞。同时研究^[1]也证明脂多糖可以刺激人和小鼠的树突状细胞产生 IL-23,所以在本实验中采用脂多糖刺激人 PBMC 12 h,通过 RT-PCR 扩增 IL-23 p19 基因,克隆至 T 载体,经测序表明序列与 GenBank 报道序列完全一致,表明我们成功地克隆了人 IL-23 p19 基因,为进一步表达人 IL-23,并深入研究其功能和作用奠定了基础。

[参 考 文 献]

[1] Oppmann B, Lesley R, Blom B, *et al.* Novel p19 protein engages

IL-12 p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12 [J]. *Immunity*, 2000, 13 (5): 715 - 725.

- [2] Goriely S, Neurath MF, Goldman M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(1): 81 - 86.
- [3] Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 683 - 747.
- [4] Belladonna ML, Renauld JC, Bianchi R, *et al.* IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2002, 168(11): 5448 - 5454.
- [5] Lankford CS, Frucht DM. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity [J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73(1): 49 - 56.
- [6] Ha SJ, Kim DJ, Baek KH, *et al.* IL-23 induces stronger sustained CTL and Th1 immune responses than IL-12 in hepatitis C virus envelope protein 2 DNA immunization [J]. *J Immunol*, 2004, 172 (1): 525 - 531.
- [7] Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(5): 489 - 498.
- [8] Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. More stories on Th17 cells [J]. *Cell Res*, 2009, 19(4): 399 - 411.
- [9] Boniface K, Blom B, Liu YJ, *et al.* From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited [J]. *Immunol Rev*, 2008, 226(1): 132 - 146.
- [10] Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, *et al.* IL-23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease [J]. *Gut*, 2008, 57(12): 1682 - 1689.
- [11] Ito H. Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody inhibits leukocyte recruitment and promotes T-cell apoptosis in a murine model of Crohn's disease [J]. *J Gastroenterol*, 2002, 37(Suppl 14): 56 - 61.

(上接第 544 页)

- [2] Babior BM. The respiratory burst of phagocytes [J]. *J Clin Invest*, 1984, 73(3): 599 - 601.
- [3] Meischl C, Roos D. The molecular basis of chronic granulomatous disease [J]. *Springer Semin Immunopathol*, 1998, 19(4): 417 - 434.
- [4] Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, *et al.* Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide [J]. *Am J Pathol*, 1985, 119(1): 101 - 110.
- [5] 吕金星, 汪健, 张锡庆, 等. Percoll 非连续密度梯度沉降法分离人外周血中性粒细胞 [J]. *上海免疫学杂志*, 2000, 20(2): 122.
- [6] Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, *et al.* Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(5): 617 - 653.
- [7] Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, *et al.* Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 178(1): 89 - 97.
- [8] Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2', 7'-dichlorofluorescein [J]. *J Leukoc Biol*, 1990, 47(5): 440 - 448.
- [9] Bonini MG, Rota C, Tomasi A, *et al.* The oxidation of 2', 7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(6): 968 - 975.
- [10] Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress [J]. *Chem Res Toxicol*, 1992, 5(2): 227 - 231.
- [11] Van Pelt LJ, Van Zwielen R, Weening RS, *et al.* Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst [J]. *J Immunol Methods*, 1996, 191(2): 187 - 196.
- [12] Smith JA, Weidemann MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 162(2): 261 - 268.
- [13] Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, *et al.* A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test [J]. *J Immunol Methods*, 1998, 219(1/2): 187 - 193.
- [14] Vuorte J, Jansson SE, Repo H. Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay [J]. *Cytometry*, 2001, 43(4): 290 - 296.