

基于高内涵筛选的铜皮石斛促进巨噬细胞吞噬作用评价方法的建立

周旋^{1,2,3}, 张海珠², 周海燕³, 王伽伯², 肖小河², 赵润怀^{3*}, 柏兆方^{2*}

(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 解放军 302 医院全军中医药研究所, 北京 100039;
3. 中国中药公司, 北京 100195)

摘要: 探讨采用高内涵筛选技术检测巨噬细胞 (RAW264.7) 吞噬荧光标记大肠杆菌 (GFP-*Escherichia coli*) 方法的灵敏性、稳定性及可靠性, 建立中药促进巨噬细胞吞噬活性的高内涵评价方法。对比考察不同的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 即细菌和细胞比值, 以及不同孵育时间对巨噬细胞吞噬细菌能力的影响 (吞噬指数=被吞噬的细菌荧光强度/巨噬细胞数), 优化高内涵筛选方法和实验参数, 并用于测定铜皮石斛对巨噬细胞吞噬作用的影响。结果表明, 吞噬指数与 MOI 值呈正相关, 孵育时间在 1.5 h 吞噬指数最高, 优化后的条件: 细胞数 1×10^4 个/孔, 孵育时间 1.5 h, MOI 值为 50 (即细菌数为 5×10^5 个/孔), 该条件下检测结果的 RSD < 10%。采用所建立的方法检测铜皮石斛调节巨噬细胞吞噬作用实验的结果显示, 在 $0.31 \sim 2.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内铜皮石斛水提液对巨噬细胞吞噬具有剂量依赖的促进作用。本文建立了巨噬细胞吞噬作用评价的高内涵筛选方法, 并进一步证明了铜皮石斛水提物促进巨噬细胞的吞噬作用。

关键词: 巨噬细胞; 吞噬作用; 大肠杆菌; 铜皮石斛

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 05-0737-08

Methodological research for the promoting effect of *Dendrobium moniliforme* on macrophage phagocytosis based on high-content screening

ZHOU Xuan^{1,2,3}, ZHANG Hai-zhu², ZHOU Hai-yan³, WANG Jia-bo², XIAO Xiao-he²,
ZHAO Run-huai^{3*}, BAI Zhao-fang^{2*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. China Military Institute of Traditional Chinese Medicine in 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China; 3. China National Traditional Chinese Medicine Corporation, Beijing 100195, China)

Abstract: The aim of the present study was to explore a sensitive, stable and reliable method for evaluating the phagocytosis, in which RAW264.7 macrophages engulfed GFP-*Escherichia coli* was tested by high-content screening technology. The study was conducted to optimize the method in evaluation of traditional Chinese medicine in the promotion of macrophage function. By testing macrophages at different ratio of bacteria to cells (multiplicity of infection, MOI), and at different incubation time, we optimized a high content screening method and the experimental parameters to determine the impact of bacteria in macrophages (fluorescence intensity index = be swallowed bacteria/macrophages). The method was used to determine whether *Dendrobium moniliforme* (DM) have effects on macrophage phagocytosis. The results show that the index has a positive

收稿日期: 2016-11-28; 修回日期: 2017-01-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274026); 国家公益性行业专项资助项目 (201507002); 2017 年北京市科委“十病十方研发”专项-中药品质评价关键技术体系与平台建设.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-88468257, E-mail: zhaorunhuai@sina.com;

Tel / Fax: 86-10-66933325, E-mail: baizf2008@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1133

relationship with MOI values, and the highest index was observed at incubation time of 1.5 h. The optimized conditions was 1×10^4 cells/well with a MOI of 50 : 1 (bacteria : cells) with incubation of 1.5 h. Under this condition, the relative standard deviation (RSD) was less than 10% in the precision test. Using the method to detect DM regulating macrophage phagocytosis experiment results showed that in $0.31 - 2.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ concentration range, DM has a dose-response effect in promoting phagocytosis. We successfully established the method for evaluation of macrophage phagocytosis, and proved the activity of DM in promotion of macrophage phagocytosis.

Key words: macrophage; phagocytosis; *Escherichia coli*; *Dendrobium moniliforme*

石斛为兰科植物金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl.、鼓槌石斛 *Dactyloctenium chrysotoxum* Lindl. 或流苏石斛 *Dendrobium fimbriatum* Hook. 的栽培品及其同属植物近似种的新鲜或干燥茎, 具有益胃生津、滋阴清热的功效^[1]。现代药理学研究表明铜皮石斛 (*Dendrobium moniliforme*, DM)、铁皮石斛和霍山石斛等都具有增强人体免疫力的作用^[2-5]。

现代增强免疫功能的研究方法主要包括增强免疫器官研究、促进免疫细胞增殖分化研究、刺激细胞因子的释放研究和促进免疫细胞吞噬功能研究等^[3,6,7]。巨噬细胞属免疫细胞, 有多种功能, 是研究细胞吞噬、细胞免疫和分子免疫学的重要对象。因此, 本研究采用体外巨噬细胞吞噬实验, 建立增强免疫类中药的生物活性评价方法。

高内涵筛选 (high-content screening, HCS) 技术是研究细胞生物学功能的常用技术。HCS 通过高分辨率的荧光成像系统进行灵敏、快速、多参数的细胞生物学信息采集与数据分析, 在保持细胞结构和功能完整的前提下, 多通道、多靶点的检测被筛样本的各项生物学功能^[8]。本研究的主要目的是探讨采用高内涵筛选技术检测巨噬细胞 (RAW264.7) 吞噬荧光标记大肠杆菌 (*GFP-Escherichia coli*) 方法的灵敏性、稳定性及可靠性, 并用于测定铜皮石斛对巨噬细胞吞噬作用的影响, 建立中药促进巨噬细胞吞噬活性的高内涵评价方法。

材料与方法

仪器与材料 TC10TM 自动细胞计数器 (Bio-Rad 公司); 常规倒置显微镜 (上海泽权仪器设备有限公司); 台式低速离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司); 高内涵筛选系统 (美国 Thermo Scientific 公司)。DMEM (HyClone 公司); 胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶 (Gibco 公司); 巨噬细胞 RAW264.7 (解放军 302 医院全军中医药研究所); 荧光标记大肠杆菌 (解放军军事医学科学院); LB 肉汤 (北京奥博星生物技术有限责任公司); 96 孔板 (Costar 3603、3599, 康宁公

司); 磷酸缓冲盐溶液 ($1 \times \text{PBS}$, HyClone 公司); 4% 多聚甲醛、诱导剂 isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Solarbio 公司); 双抗 (青霉素、链霉素, Gibco 公司); 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Life Technologies 公司); lipopolysaccharide (LPS)、Triton (Sigma 公司); CCK-8 试剂 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司); 纯净水 (娃哈哈集团公司); 铜皮石斛 (中国中药霍山石斛公司)。

细菌培养 将菌液以 1% 比例接种到 15 mL 离心管, 于 37°C 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇菌过夜, 再以 1% 比例接种到新的 50 mL 离心管中 (LB 肉汤培养基), 于 37°C 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇菌 3.5 h; 加 IPTG, 于 16°C 、 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇菌过夜, 得到带绿色荧光的 *GFP-E.coli*。

细胞培养 小鼠 (*Mus musculus*) 巨噬细胞系 RAW264.7 细胞株由解放军 302 医院全军中医药研究所提供。待细胞复苏后, 用含 10% 胎牛血清、1% 双抗 ($100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素和 $100 \mu \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素) 的 DMEM 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium) 在充 5% CO_2 的孵育箱中 37°C 培养细胞。

吞噬实验影响因素考察

孵育时间考察 将处于对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶进行消化, 调整细胞数为 1×10^4 个/孔, 接种于 96 孔板中, 共设计 12 个复孔 (4 组, 每组 3 个复孔), 贴壁 12 h 后, 加入 MOI 值为 50 的 *GFP-E.coli*, 放入含 5% CO_2 、 37°C 孵育箱中孵育, 4 组的孵育时间分别为 2、1.5、1 和 0.5 h; 终止孵育, 弃去上清液, 用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗; 再用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗; 加 0.3% Triton- $1 \times \text{PBS}$ 破膜 10 min, 用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗; 加 1% DAPI 染料染核, 最后用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗, 使用高内涵筛选仪器采集荧光图像并分析。

MOI 值考察 按如上方法操作, 其中共设计 9 个复孔 (3 组, 每组 3 个复孔), 每组分别加入 MOI 值为 50、25 和 12.5 的 *GFP-E.coli*, 放入含 5% CO_2 、 37°C 孵育箱中孵育 1.5 h。

方法重现性的考察 考察不同板、不同时间点操作下, 本实验所建立方法的重现性, 每次实验设 3 个

复孔, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计算不同批次间实验数据的 RSD 值。

高内涵筛选系统检测及分析 开启 Thermo Scientific 高内涵分析仪, 启动 Angiogenesis Assay 软件, 打开 Configure Acquisition 板块, 使用 20 倍物镜, 设置孔板类型和扫描范围, 扫描视野设定为 4×4 个, 即每个孔中采集 16 个视野, 固定 channel 1 (DAPI 荧光通道) 和 channel 2 (GFP-*E.coli* 荧光通道) 两种荧光通道的扫描波长、聚焦位置、曝光强度和曝光时间等参数后进行扫描。扫描结束后, 打开 Configure Assay Parameters 分析之前扫描的原始数据, 扣除背景色后, 固定计算参数, 经软件分析得到每个孔吞噬指数 (软件自动计算公式: 吞噬指数=被吞噬的细菌荧光强度/巨噬细胞数), 并计算每组平均吞噬指数。

高内涵筛选技术检测铜皮石斛对巨噬细胞吞噬功能的影响

供试品溶液的制备 将铜皮石斛用高速粉碎机粉碎并过 60 目筛, 得到铜皮石斛粉末。精密称取 0.3 g 粉末, 加水 200 mL, 加热回流 2 h, 趁热抽滤, 将滤液减压浓缩, 冻干。精密称取一定量的冻干品, 用含 10% 胎牛血清、1% 双抗 DMEM 培养基制备成质量浓度为 0.31~2.50 g·L⁻¹ 的供试品溶液, 备用。

样品对细胞活力检测 实验共分成 6 个组, 分别为 0.31、0.63、1.25 和 2.5 g·L⁻¹ DM 组、对照组 (不给药) 和空白组 (不接种细胞、不给药), 每组 3 个复孔。取对数生长期的巨噬细胞, 调整细胞数为每毫升 2×10^5 个, 接种于 96 孔板中的给药组、对照组, 贴壁 12 h 后, 弃去上清液, 加入上述制备的供试品溶液, 继续培养 24 h 后进行检测。取一定量的 CCK-8 溶液, 用含 10% FBS 稀释 10 倍。先吸去 96 孔板中每孔的上清液, 加入稀释后的 CCK-8 溶液 100 μL, 此时将稀释后的 CCK-8 溶液按每孔 100 μL 加入 96 孔板未接种细胞的孔中作为空白组, 在培养箱中孵育 40 min 后, 酶标仪读取波长 450 nm 下的吸光度 (OD) 值, 将各测试孔 OD 值减去空白 OD 值, 细胞存活率 = $(OD_{\text{铜皮石斛组}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。根据不同浓度的铜皮石斛水提液对巨噬细胞存活率影响, 绘制巨噬细胞活力曲线。

吞噬实验 实验共分成 6 个组, 分别为 0.31、0.63、1.25 和 2.5 g·L⁻¹ DM 组、阳性药 LPS (100 ng·mL⁻¹) 组、空白对照组 (不给药), 每组 3 个复孔。按如上方法, 调整细胞数为 1×10^4 个/孔, 贴壁 12 h 后, 加药培养 12 h 后, 加菌, 其中 MOI 值为 12.5~50, 孵育时间为 0.5~2 h, 使用高内涵筛选仪器采集荧光图

像并分析, 计算吞噬百分率 (吞噬百分率 = 给药组平均吞噬指数/对照组平均吞噬指数 × 100%)。

统计学分析 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间数据比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 least significant difference (LSD) 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 吞噬实验的影响因素

1.1 不同孵育时间 图 1 为不同孵育时间对巨噬细胞吞噬 GFP-*E.coli* 的考察结果。在 MOI 值为 50、孵育时间为 0.5~2 h 的条件下, 高内涵筛选仪器拍摄的巨噬细胞吞噬 GFP-*E.coli* 图片见图 1A, 细胞核被 DAPI 染色后在 386 nm 波长下发蓝色荧光; 标记后的 GFP-*E.coli* 为巨噬细胞吞噬的大肠杆菌, 在 485 nm 波长下发绿色荧光; 最右列为软件自动定量分析识别图, 图中绿色线圈标出每个细胞, 线圈的大小代表每个细胞的大小, 线圈内的绿色荧光为被吞噬的 GFP-*E.coli*, 从图 1A 中能明显看到孵育时间为 1.5 h 时细胞吞噬的 GFP-*E.coli* 能力最强。图 1B 为定量分析结果, 每组平均吞噬指数 (RSD < 10%) 变化规律的曲线分析图, 孵育 0~1.5 h 时, 随孵育时间延长, 吞噬指数增加; 1.5 h 时, 平均吞噬指数达到最大值; 2 h 时, 平均吞噬指数略有下降。

1.2 不同 MOI 值 图 2 为不同 MOI 值对巨噬细胞吞噬 GFP-*E.coli* 的考察结果。在孵育时间 1.5 h、不同 MOI 值条件下, 高内涵筛选仪器拍摄的巨噬细胞吞噬 GFP-*E.coli* 图片见图 2A。从图中可见, MOI 值为 50 时, 巨噬细胞吞噬作用较强。孵育时间 1.5 h、不同 MOI 值条件下平均吞噬指数 (RSD < 5%) 变化规律的曲线分析图 2B, 从图中可见吞噬指数与 MOI 值正相关。

2 方法重现性

不同 96 孔板之间重现性考察结果: 平均吞噬指数为 165.23, RSD 值为 6.65%; 不同时间重现性考察结果: 平均吞噬指数为 174.43, RSD 值为 1.99%。综上所述, RSD 值均在 10% 内, 说明该方法重现性良好, 可以用于评价中药的促进巨噬细胞吞噬活性。

3 高内涵筛选技术检测铜皮石斛对巨噬细胞活力及吞噬功能的影响

3.1 样品对巨噬细胞活力影响 用 CCK-8 法测定铜皮石斛水提液对巨噬细胞活力的影响, 结果如图 3 所示。由图 3 可见, 质量浓度在 0.31~2.50 g·L⁻¹ 内铜皮石斛对细胞活力影响均为无毒性作用。在 0.31、

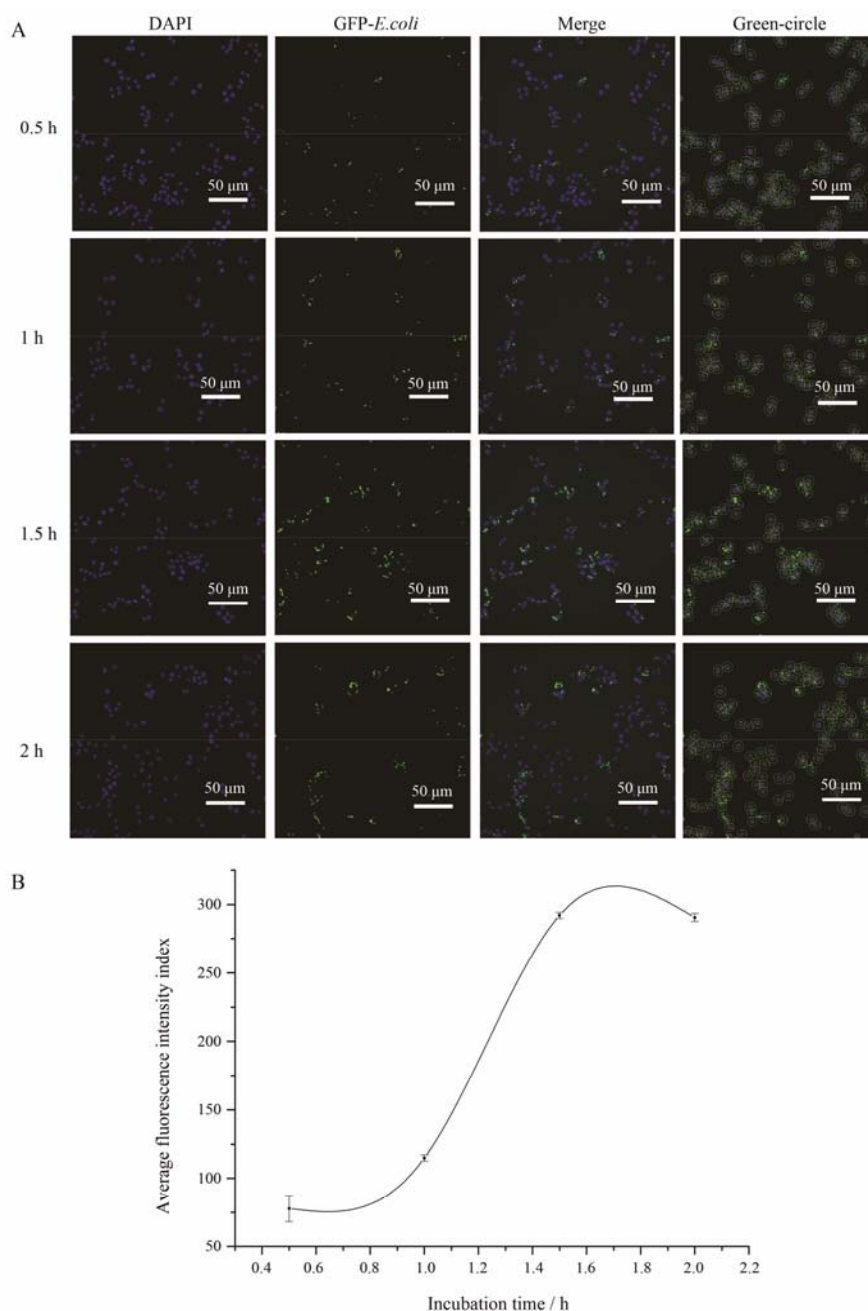


Figure 1 Influence of different incubation time (0.5, 1, 1.5, 2 h) on intracellular bacterial infection of macrophage cell. A: Representative pictures of macrophages infected with GFP-*E.coli* in different incubation time, taken by high content screening. “DAPI” panels was the nucleus which was stained by 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; “GFP-*E.coli*” panels represent GFP-*Escherichia coli*; “Merge” panels was that the nucleus images merged with GFP-*E.coli* images. The right-hand panels (Green-circle) show that green line circle out of the cells. The coil size corresponds to the cell size. The bacteria within the coil were swallowed by cells. B: Influence of different incubation time on average fluorescence intensity index ($n=3$, RSD<10%), under the multiplicity of infection (MOI) values for 50. Fluorescence intensity index represents the fluorescence intensity of bacteria swallowed by the average macrophage in a well

0.63 和 1.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 铜皮石斛水提液具有促进巨噬细胞增殖作用, 细胞存活率分别为 118.30%、110.39% 和 105.25% ($P<0.01$); 2.50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对细胞生长略有抑制作用, 细胞存活率为 95.20%, 与空白组比较, 无显著性差异 ($P>0.05$)。

3.2 高内涵筛选技术检测铜皮石斛对巨噬细胞吞噬功能的影响 0.31~2.50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铜皮石斛水提液对巨噬细胞吞噬 GFP-*E.coli* 的影响见图 4A, 从图中可见, 随着生药浓度的增加, 细胞吞噬的 GFP-*E.coli* 增多。0.31~2.50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铜皮石斛水提液和 LPS 对巨噬细胞

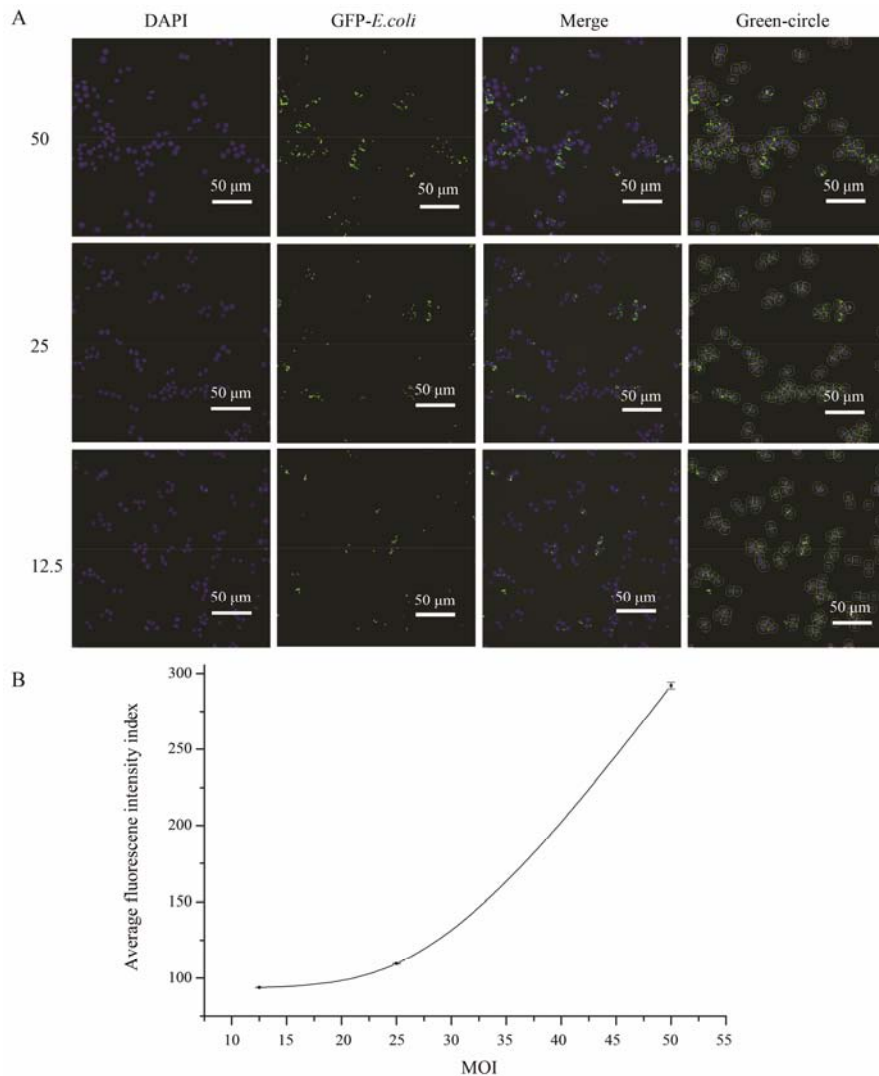


Figure 2 Influence of different multiplicity of infection (MOI, 12.5, 25, 50) on intracellular bacterial infection of macrophage cell. A: Representative pictures of macrophages infected with GFP-*E. coli* in different MOI, taken by high content screening. B: Influence of different MOI on average fluorescence intensity index ($n=3$, RSD<5%), under incubation time for 1.5 h

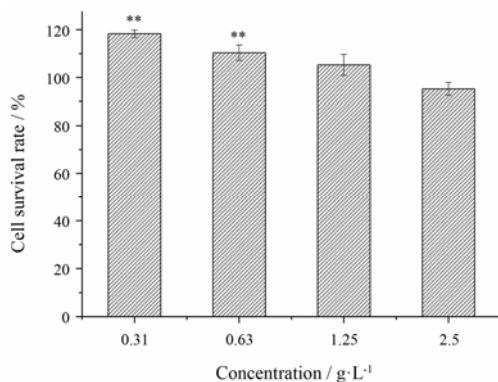


Figure 3 Influence of co-treatment with different concentration of *Dendrobium moniliforme* (DM) on macrophage activity. DM-treated groups incubated in 0.31, 0.63, 1.25, 2.5 g·L⁻¹ of DM on macrophage activity, detected by CCK8 method. The group unincubated in DM served as a control group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P<0.01$ vs control group

吞噬百分率的影响见图 4B, 从图中可知, 随着浓度增加, 细胞吞噬百分率增大, 说明铜皮石斛水提液对巨噬细胞吞噬功能具有剂量依赖的促进作用。

讨论

目前检测巨噬细胞吞噬功能的方法主要包括显微镜镜检计数法^[9, 10]和流式细胞术^[8, 11]。显微镜镜检计数法存在主观性强、重复性差及耗时长等缺点, 影响实验结果的客观性与准确性^[9, 10]。流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 最适宜定量分析悬浮细胞的形态与功能^[8], 由此需要将贴壁细胞制备成悬浮细胞, 目前有研究者采用细胞刮刀方法^[12], 此方法对细胞损伤太大且容易造成较大误差, 也有用胰酶消化方法, 但酶消化 30 min 无法充分消化, 只能部分上清液

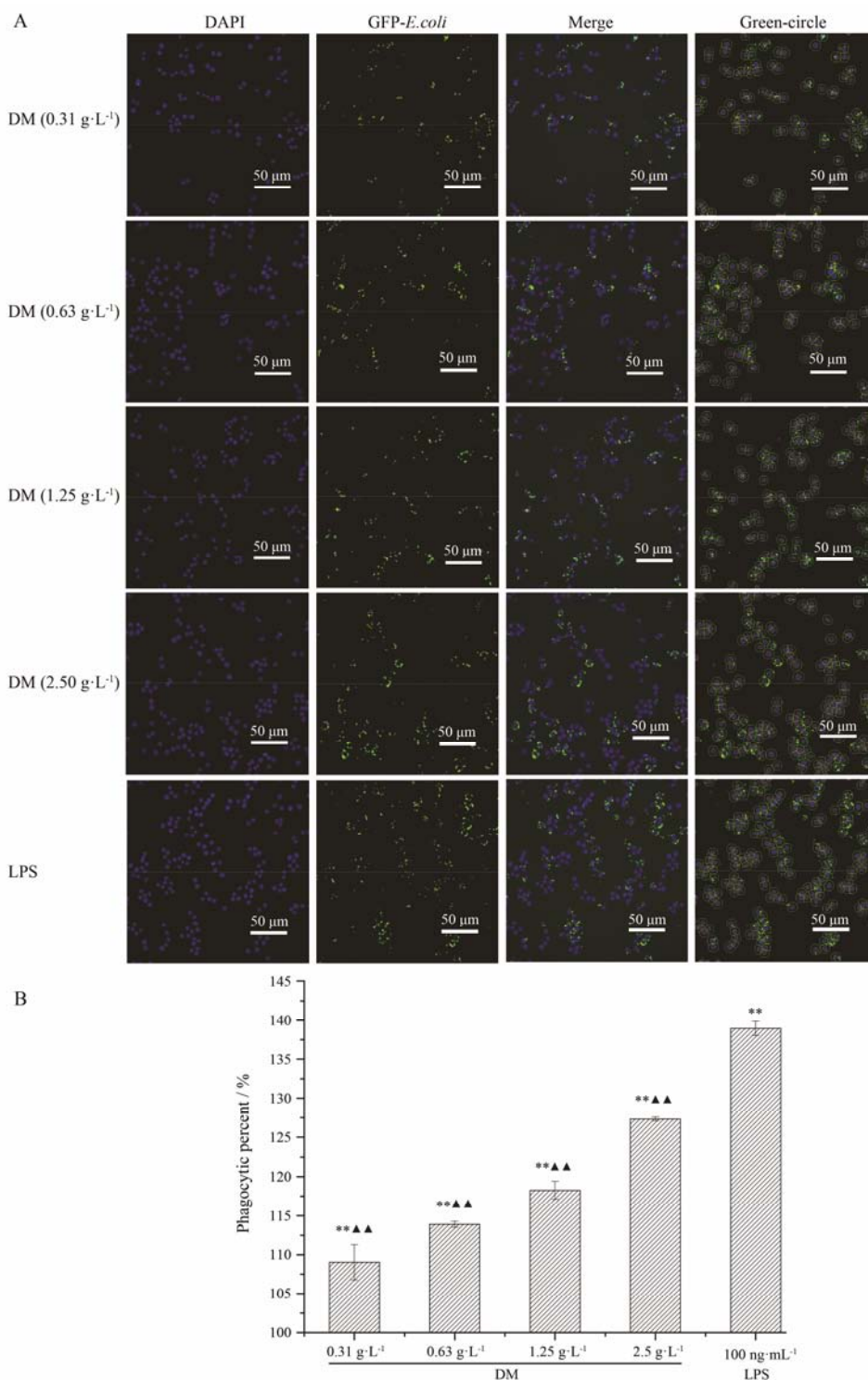


Figure 4 Influence of co-treatment with different concentration of DM on intracellular bacterial infection of macrophage cell. A: Representative pictures of macrophages incubated with different concentration of DM and lipopolysaccharide (LPS), then infected with GFP-*E.coli*, taken by high content screening; B: Influence of co-treatment with different concentration of DM and LPS on phagocytic percent. Fluorescence intensity index represents the fluorescence intensity of bacteria swallowed by the average macrophage in a well. The group unincubated in DM served as a control group, LPS-treated group served as a positive drug group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; ▲▲ $P < 0.01$ vs positive drug group

上机测试, 导致吞噬率和吞噬指数偏低, 不能准确反映巨噬细胞吞噬能力, 且消化时间过长, 操作步骤多,

对于大批量样本检测有难度, 所以不推荐使用酶消化^[11]。HCS 采用的是贴壁细胞, 不需要将贴壁细胞制

备成悬浮细胞,因此不会造成细胞损伤或损失,与FCM相比具有一定的优势。Coelho等^[13]采用激光共聚焦技术观察巨噬细胞体外吞噬作用,再运用高通量技术对其进行定量,而高内涵筛选技术为激光共聚焦和高通量两项技术相结合的产物。因此,采用高内涵筛选技术检测巨噬细胞吞噬细菌的方法,操作更简单、方便和快捷。同时高内涵筛选系统是在固定曝光强度、曝光时间和视野放大倍数等参数的情况下进行扫描,并且自动完成全视野细胞数和荧光强度定量分析,然后在固定计算参数情况下对所有扫描视野和组别进行自动计算平均荧光强度,而细菌来自单一细菌克隆,因此单个细菌之间的荧光强度是一致的,通过计算单个细胞的平均荧光强度,从而反映细胞吞噬细菌的能力,显著降低数据采集过程中人为因素干扰,数据更加客观、稳定,这也是高内涵方法的优势所在。

根据近几年国内外相关文献报道,巨噬细胞吞噬的主要影响因素为MOI值与孵育时间,且不同文献所采用的MOI值与孵育时间具有一定的差异,即MOI值在0~100之间,孵育时间在0.5~2 h内^[13-18]。因此,本研究系统摸索了可能影响吞噬百分率的实验条件,即不同MOI值与不同孵育时间对巨噬细胞吞噬作用的影响,研究发现MOI越高,吞噬指数越高,可见巨噬细胞的吞噬能力很强,不易达到饱和。但MOI值过高会影响细胞活力甚至造成细胞死亡,同时也会影响实验操作中的清洗过程,未被吞噬的GFP-*E.coli*清洗不干净会影响结果分析,MOI值为50时较为适合药物吞噬作用评价。巨噬细胞对GFP-*E.coli*的吞噬百分率随孵育时间的延长而增高,在1.5 h时吞噬指数达到最高,2 h时吞噬指数则略有下降,但通过SPSS分析发现巨噬细胞在1.5和2 h吞噬率无显著性差异,说明在1.5~2 h间巨噬细胞吞噬能力处于一个平稳期。综上可见,MOI值为50,孵育时间1.5 h为最佳实验条件,可快速而又稳定地反映巨噬细胞的吞噬能力。

在此基础上,利用构建的巨噬细胞吞噬大肠杆菌高内涵筛选体系对铜皮石斛调节巨噬细胞的吞噬作用进行了评价,同时选择具有文献报道^[19]的对巨噬细胞吞噬具有显著促进作用的LPS作为阳性对照,结果显示,在0.31~2.50 g·L⁻¹内铜皮石斛可增强巨噬细胞吞噬能力并呈量效关系,且浓度为2.50 g·L⁻¹时,巨噬细胞吞噬作用达到最大值,但其作用弱于LPS。

本研究成功建立了巨噬细胞吞噬作用评价的高内涵筛选方法,并进一步证明了铜皮石斛水提物促进巨噬细胞的吞噬作用。高内涵筛选技术检测巨噬细胞吞噬作用的方法具有快速、稳点的特点,能精确地反映巨噬细胞吞噬能力,因此巨噬细胞吞噬大肠杆菌的高内涵筛选方法对于铜皮石斛等免疫调节类中药的质量生物评价和药效物质研究具有重要的应用价值。

References

- [1] China Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia (中国药典) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 92.
- [2] Chen ZH, Chen YL, Wu T. Study on structural characteristics and immunomodulatory activity of polysaccharides DMP4a-1 from *Dendrobium moniliforme* [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2005, 23: 1781-1784.
- [3] Lv GY, Yan MQ, Chen SH. Research progress of efficacy related pharmacological activities for *Dendrobium officinale* [J]. China J Chin Mate Med (中国中药杂志), 2013, 38: 489-493.
- [4] Hao R, Wang ZM, Zha XQ, et al. Intestinal mucosal immunomodulating activity of polysaccharide from *Dendrobium huoshanense* and its absorption and distribution in small intestine [J]. Food Sci (食品科学), 2014, 35: 256-259.
- [5] Qian XP, Zha XQ, Xiao JJ, et al. Sulfated modification can enhance antiglycation abilities of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* [J]. Carbohydr Polym, 2014, 101: 982-989.
- [6] Li SL, Chen C, Yang SL, et al. Immunomodulatory active fraction of protocorm-like bodies in *Dendrobium huoshanense* and its toxicological safety [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2012, 35: 321-327.
- [7] Lin JW, Chang YJ, Yang WB, et al. The multifaceted effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium huoshanense* on immune functions with the induction of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) in monocytes [J]. PLoS One, 2014, 9: e94040.
- [8] Cui W, Li YL, Wu YN, et al. Application of high-content screening and flow cytometry analysis techniques to evaluation of myocardial fibroblasts proliferation [J]. Acta Physiol Sin (生理学报), 2014, 66: 215-222.
- [9] Zhou HF, Xu Q, Bian YH, et al. Improvement of mouse peritoneal macrophages (MPM) phagocytosis test [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med (天津中医药大学学报), 2015, 34: 279-282.

- [10] Gu YF, Ding JJ, Sun Y, et al. Effect of jujube polysaccharide on the function of peritoneal macrophages in mice [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol (中国中医药科技), 2009, 16: 290–291.
- [11] Chen DY, Lu LD, Yu P, et al. A method for evaluating phagocytosis of mouse peritoneal macrophages by flow cytometry [J]. Chin J Immunol (中国免疫学杂志), 2014, 30: 1074–1077.
- [12] Chua RYR, Wong SH. SNX3 recruits to phagosomes and negatively regulates phagocytosis in dendritic cells [J]. Immunology, 2012, 139: 30–47.
- [13] Coelho C, Tesfa L, Zhang JH, et al. Analysis of cell cycle and replication of mouse macrophages after *in vivo* and *in vitro* *Cryptococcus neoformans* infection using laser scanning cytometry [J]. Infect Immun, 2012, 80: 1467–1478.
- [14] Carrasco SE, Troxell B, Yang YY, et al. Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages [J]. Infect Immun, 2015, 83: 4848–4860.
- [15] Astarie-Dequeker C, Guyader LL, Malaga W, et al. Phthiocerol dimycocerosates of *M. Tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids [J]. PLoS Pathog, 2009, 5: e1000289.
- [16] Venter G, Oerlemans FT, Wijers M, et al. Glucose controls morphodynamics of LPS-stimulated macrophages [J]. PLoS One, 2014, 9: e96786.
- [17] Cano LE, Brummer E, Stevens DA, et al. Fate of conidia from *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine treated macrophages [J]. Infect Immun, 1992, 60: 2096–2100.
- [18] Cano LE, Go'mez B, Brummer E, et al. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin [J]. Infect Immun, 1994, 62: 1494–1496.
- [19] Chen YJ, Hsieh MY, Chang MY, et al. Eps8 protein facilitates phagocytosis by increasing TLR4-MyD88 protein interaction in lipopolysaccharide-stimulated macrophages [J]. J Biol Chem, 2012, 287: 18806–18819.