

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)10-1072-04

## 自然戒断期成瘾药物依赖者 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> 调节性 T 细胞的变化特征及意义

王文洋<sup>1</sup>, 张荣波<sup>1,2\*</sup>, 邢应如<sup>3</sup>, 张世武<sup>3</sup>, 胡东<sup>1,2\*</sup>, 吴静<sup>1,2</sup>, 何江<sup>1</sup>, 杨小康<sup>1</sup>, 付计锋<sup>2</sup>, 赵辉<sup>2</sup>, 胡乐林<sup>2</sup> (安徽理工大学: <sup>1</sup>医学院免疫与检验教研室; <sup>2</sup>免疫与感染研究所; <sup>3</sup>附属医院检验科, 安徽淮南 232001)

**[摘要]** 目的 研究自然戒断期成瘾药物依赖者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> 调节性 T 细胞 (Treg) 及外周血单个核细胞 (PBMC) 中转化生长因子-β1 (TGF-β1) mRNA 表达水平的变化, 探讨成瘾药物对成瘾药物依赖者体内 Treg 的影响。方法 采集自然戒断 6 个月和 18 个月半的成瘾药物依赖者各 40 例及 30 例健康人的外周血, 使用流式细胞仪检测 Treg, 用 RT-PCR 检测 PBMC 中 TGF-β1 mRNA 表达水平。结果 与对照组比较, 戒断 18 个月组 Treg、TGF-β1 mRNA 含量显著增高, 而戒毒 6 个月组未发现显著性变化。结论 成瘾药物对依赖者 Treg 的影响是长期性的, 其介导的 Treg 异常, 可能是引起成瘾药物依赖者免疫功能紊乱的原因之一。

**[关键词]** 成瘾药物依赖者; 转化生长因子 β1; 调节性 T 细胞; 自然戒断期

**[中图分类号]** R392.11, R163 **[文献标志码]** A

## Changes and the implications of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> regulatory T cells in drug addicts during natural drug withdrawal

WANG Wenyang<sup>1</sup>, ZHANG Rongbo<sup>1,2\*</sup>, XING Yingru<sup>3</sup>, ZHANG Shiwu<sup>3</sup>, HU Dong<sup>1,2\*</sup>, WU Jing<sup>1,2</sup>, HE Jiang<sup>1</sup>, YANG Xiaokang<sup>1</sup>, FU Jifeng<sup>2</sup>, ZHAO Hui<sup>2</sup>, HU Lelin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Laboratory Medicine, Medical School, <sup>2</sup>Institute of Infection and Immunology, <sup>3</sup>Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China

**[Abstract]** **Objective** To study the changes of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> regulatory T cells (Tregs) and transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in drug addicts during natural drug withdrawal, and explore the effects of addictive drugs on their Tregs. **Methods** Peripheral blood was collected from 40 drug addicts with 6-month natural withdrawal, 40 cases with 18-month natural withdrawal and 30 healthy controls. Then the Tregs were counted by flow cytometry and TGF-β1 mRNA expression in PBMCs was detected by RT-PCR. **Results** Compared with the controls, Tregs and TGF-β1 mRNA expression in PBMCs increased significantly in the group with one 18-month natural withdrawal, but no significant difference was found in the group with 6-month natural withdrawal. **Conclusion** Addictive drugs have a long-term effect on the Tregs in drug addicts, and the abnormal Tregs may result in the immune dysfunction in drug addicts.

**[Key words]** drug addicts; TGF-β1; regulatory T cells; natural drug withdrawal

当今社会, 毒品在全世界呈蔓延趋势, 已经成为全球广泛关注的严重社会问题。毒品引起的免疫功能紊乱是依赖者人群中感染性疾病高发的最主要的原因, 但毒品对成瘾依赖者免疫功能紊乱的机制仍不清楚<sup>[1]</sup>。调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 是一类具有免疫抑制作用的 T 细胞亚群, 对维持机体

免疫平衡起着关键作用, 其特征性标记为 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>, 但由于 Foxp3 位于细胞内, 实验方法繁琐, 不适合大批量的检测, 相对于 Foxp3 而言, 近期发现的 CD127 膜标记分子可以用来更好地展现 Treg 的典型特征, 并且操作简便、临床评价效果好<sup>[2-3]</sup>。本研究使用 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> 标记细胞

收稿日期: 2013-04-27; 接受日期: 2013-05-13

基金项目: 安徽省蚌埠强制隔离戒毒所科技资助基金(2012年); 安徽省自然科学基金(1208085QH162); 国家自然科学基金(81202294; 81172778; 61170172)

作者简介: 王文洋(1989-), 男, 山东泰安人, 硕士研究生

Tel: 13637111911; E-mail: wenyang11@sina.com

\* Corresponding authors, 张荣波, E-mail: austimmunologyteam@126.com; 胡东, E-mail: austhudong@126.com

做为 Treg, 主要观察了成瘾药物依赖者在自然戒断期内 Treg 水平以及外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 中转化生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) mRNA 表达水平。

## 1 对象和方法

### 1.1 材料

1.1.1 对象 自然戒毒期内成瘾药物依赖者: 分为6个月组与18个月组。半年组为安徽省蚌埠强制隔离戒毒所2012年10月收治的符合 DSM-IV 诊断标准且入所时间在6个月之内的40例强制戒毒人员, 均为男性, 年龄17~43岁, 平均年龄为(29.8±6.8)岁; 18个月组为安徽省蚌埠强制隔离戒毒所2011年09月收治的符合 DSM-IV 诊断标准且入所时间在18个月之内的40例强制戒毒人员, 均为男性, 年龄21~56岁, 平均年龄为(32.8±7.4)岁。两组依赖者均在2013年3月份同时由强制隔离戒毒所医护人员进行采血检测, 此时自然戒断时间分别为6个月和18个月。所有依赖者毒品类型为海洛因和冰毒, 吸毒方式为烫吸和静脉注射, 依赖者无近期感染, 无 HIV、HBV、HCV 及淋病感染, 无其他免疫相关疾病, 无影响免疫功能的用药史。正常对照组为安徽理工大学附属医院常规体检健康人30例, 均为男性, 年龄20~84岁, 平均年龄为(33.2±7.4)岁, 从未接触过阿片类药物。正常对照组与成瘾药物依赖者在年龄上无显著性差异。

1.1.2 仪器和试剂 FACS Calibur 流式细胞仪为 BD 公司产品, PerCP-Cy5.5 标记的小鼠抗人 CD4 单克隆抗体 (mAb), PE 标记的小鼠抗人 CD25 mAb, Alexa Fluor® 647 标记的小鼠抗人 CD127 mAb 以及同型对照小鼠抗人 IgG1 均购自 BD 公司。逆转录试剂盒为购自宝生物大连有限公司, TGF- $\beta 1$  mRNA 引物自行设计由上海生物工程公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 TGF- $\beta 1$  mRNA 检测引物设计 根据 GenBank 提供的 TGF- $\beta 1$  mRNA 序列 (NM\_000660.4), 设计合成引物 P1/P2。P1: 5'-GCCCTGGACACCAACTATTGC-3', P2: 5'-AGGCTCCAAATGTAGGGCAG-3'。产物大小161 bp。根据文献<sup>[4]</sup>合成  $\beta$ -actin 引物 P1/P2。P1: 5'-TGTACGCCAACACAGTCTG-3', P2: 5'-TCAGGAGCAATGATCTTG-3', 产物大小为123 bp。

1.2.2 标本采集 所有受试者于清晨空腹抽取静脉血 5 mL, EDTA 抗凝, 标本禁溶血、禁凝血。

1.2.3 流式细胞仪检测 Treg 细胞 抗凝全血在采集 2 h 内进行测定, 检测时取抗凝全血 100  $\mu$ L 加入 CD4-PerCP-Cy5.5、CD25-PE、CD127-Alexa Fluor® 647 各 20  $\mu$ L (同型对照管加入同型抗体 20  $\mu$ L), 充分混匀, 室温避光放置 30 min 后加入 2 mL 红细胞裂解液室温溶解红细胞 10 min; 待完全溶血后离心 (1 500 r/min) 5 min 弃上清, 加入 2 mL PBS 再次离心 (1 500 r/min) 5 min 弃上清; 最后用 0.5 mL PBS 重悬沉淀, 使用流式细胞仪 BD FACS Calibur 检测, Cell Quest 软件对数据进行分析, 记录阳性细胞百分率, 减去非特异性对照组。以前向散射光和侧向散射光设定淋巴门, 再以 CD4<sup>+</sup>和侧向

散射光设定 CD4<sup>+</sup>淋巴细胞门, 以 CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>占 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的百分比计为 Treg 的比例。

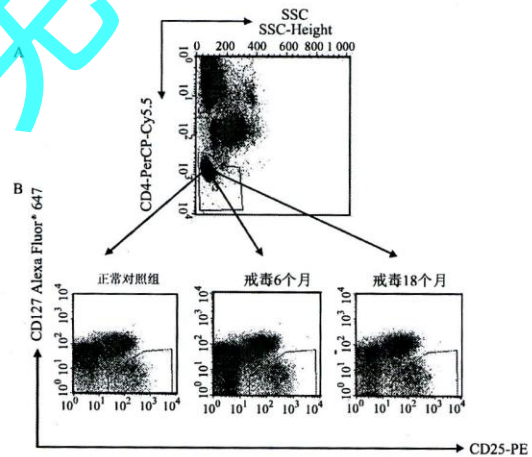
1.2.4 RT-PCR 检测 PBMC 中 TGF- $\beta 1$  mRNA 水平 使用 Ficoll 分离液分离 PBMC, 采用 TRIzol 法常规提取细胞总 RNA, 严格按照 TAKARA 逆转录试剂盒说明, 将 2  $\mu$ L 总 RNA 逆转录成 cDNA。PCR 反应体系: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C (TGF- $\beta 1$ ) 或 52 $^{\circ}$ C ( $\beta$ -actin) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 32 个循环, 最后 78 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。PCR 扩增产物在 20 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳, 通过 TGF- $\beta 1$  和  $\beta$ -actin 条带吸光度比值作为 TGF- $\beta 1$  相对表达强度。

1.2.5 统计学分析 实验结果均为计量资料, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。使用 GraphPad Prism 5 进行统计分析, 统计处理采用 ANOVA 进行多组均数间的比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

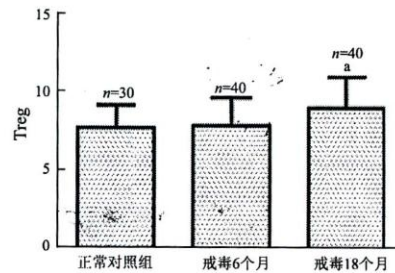
### 2.1 成瘾药物依赖者与正常对照组 Treg 的比较

使用流式细胞仪检测各组外周血 Treg 水平, 统计发现戒毒 6 个月组 (7.83±1.60) 与正常对照组 (7.68±1.43) 外周血 Treg 水平无显著性差异, 戒毒 18 个月组 (8.77±1.88) 高于戒毒 6 个月组和正常对照组, 结果有显著性差异 (图 1, 图 2,  $P < 0.05$ )。



A: CD4<sup>+</sup>和侧向散射光设定 CD4<sup>+</sup>淋巴细胞门; B: 不同组 CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>占 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的百分比。

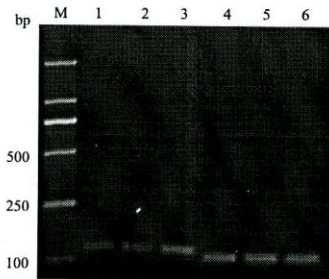
图 1 流式细胞仪检测 Treg



\* $P < 0.05$  vs 戒毒 6 个月组和正常对照组。

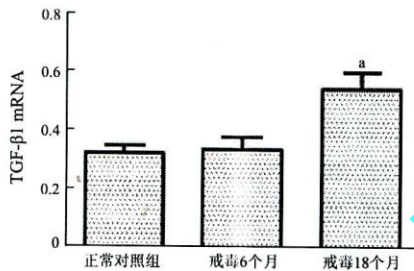
图 2 各组外周血 Treg 的水平比较

**2.2 成瘾药物依赖者与正常对照组 PBMC 中 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的比较** 通过 RT-PCR 检测各组 PBMC 中 TGF- $\beta$ 1 mRNA, 统计发现戒毒 6 个月组 PBMC 中 TGF- $\beta$ 1 mRNA 水平为  $0.332 \pm 0.043$ , 与正常对照组 ( $0.318 \pm 0.027$ ) 水平无显著性差异, 戒毒 18 个月组 TGF- $\beta$ 1 mRNA 水平为  $0.539 \pm 0.059$ , 高于戒毒 6 个月组和正常对照组, 结果有显著性差异 ( $P < 0.05$ , 图 3、4)。



M: DL2000 DNA marker; 1: 正常对照组; 2: 戒毒 6 个月组; 3: 戒毒 18 个月组; 4~6:  $\beta$ -actin.

图 3 外周血单个核细胞 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的 cDNA 扩增产物电泳图



\* $P < 0.05$  vs 戒毒 6 个月组和正常对照组.

图 4 各组 PBMC 中 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的比较

### 3 讨论

Treg 是一类主要起免疫抑制作用的  $CD4^+$  T 细胞亚群, 与多种免疫性疾病的发生有关, 并且在肿瘤、炎症性疾病、器官移植等方面起着重要的作用<sup>[5]</sup>。当 Treg 发生紊乱并过度发挥作用时, 会干扰机体的免疫力, 甚至会引起肿瘤细胞的扩散、增殖和转移<sup>[6]</sup>。在对成瘾药物依赖者的研究中发现, 其体内免疫功能紊乱且持续时间较长<sup>[7-8]</sup>, 过去观点主要认为是阿片类药物通过直接和间接作用, 在神经系统和内分泌系统共同参与下导致机体免疫功能的降低甚至缺陷<sup>[9]</sup>。是否 Treg 对依赖者的免疫功能紊乱起一定作用呢? 通过本研究发现 Treg 的比例在依赖者体内有异常, 认为其可能是引起免疫功能紊乱的原因之一。

本研究结果证明戒毒 18 个月组外周血 Treg 比例

高于对照组, 表明成瘾药物依赖者体内 Treg 存在过度表达, 与 Riss 等<sup>[1]</sup> 研究结果一致。过度表达的 Treg 可能通过细胞间接触, 或分泌 TGF- $\beta$  和 IL-10 来抑制 T 细胞的活化增殖<sup>[10]</sup>, 达到抑制细胞免疫的效应。成瘾药物依赖者体内 Treg 水平的过度表达可能是引起该人群免疫力低下的原因之一。但有趣的是, 戒毒 6 个月组外周血 Treg 比例与对照组相比无显著性差异, 其原因可能是由于成瘾药物对依赖者的长期影响尚未体现。有研究证实成瘾药物依赖者在急性戒毒后体内一些免疫指标呈一过性的变化, 在较长时间后才能恢复正常<sup>[11]</sup>, 也有资料也表明成瘾药物的急性戒毒反而会引起机体对疾病的易感性<sup>[12]</sup>, 这些研究提示成瘾药物对依赖者免疫功能有长期影响, 但对于免疫功能持续损伤的机制还需进一步研究。

由于 Treg 可通过分泌 TGF- $\beta$  来抑制 T 细胞的活化增殖, 本研究检测了 PBMC 中的 TGF- $\beta$ 1 mRNA。有研究发现 PBMC 中 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平与 Treg 水平有相同的变化趋势<sup>[13-14]</sup>。本研究结果发现, 戒毒 18 个月组 TGF- $\beta$ 1 mRNA 显著高于对照组和 6 个月组, 提示成瘾药物依赖者 PBMC 内 TGF- $\beta$ 1 表达水平升高, 推测可能是由成瘾药物依赖者体内异常 Treg 所导致。TGF- $\beta$ 1 不仅可以干扰 B 细胞的免疫球蛋白类型转换, 还可以影响自然杀伤细胞增殖分化, 并且可以通过干预白细胞介素-2 (IL-2)、 $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 的合成起到免疫抑制作用<sup>[15-16]</sup>。表达过量的 TGF- $\beta$ 1 可能对依赖者机体发挥过度的免疫抑制作用。已有报道, 成瘾药物依赖者自然戒毒前血清 TGF- $\beta$ 1 低于正常水平<sup>[17]</sup>, 但未对 PBMC 中 TGF- $\beta$ 1 水平进行检测。当然, 为了更准确地检测 Treg 分泌的 TGF- $\beta$ 1 水平, 将会在后续研究中对 Treg 内 TGF- $\beta$ 1 水平进行检测。

综合以上分析, 本研究结果表明自然戒毒期成瘾药物依赖者 Treg 有一定程度的增高, 并提示成瘾药物对依赖者的免疫调节有较长期的影响, 推测 Treg 可能是引起依赖者免疫功能紊乱的原因之一。然而, 本次研究不足之处是没有考虑强制隔离戒毒人员的心理压力以及健康状况, 将在下一步工作中综合以上因素, 系统分析 Treg 在成瘾药物依赖者免疫调节中的作用。

### 参考文献:

- [1] Riss GL, Chang DI, Wevers C, et al. Opioid maintenance therapy restores  $CD4^+$  T cell function by normalizing  $CD4^+$   $CD25^{high}$  regulatory T cell frequencies in heroin user[J]. Brain Behav Immun, 2012, 26

- (6): 972-978.
- [2] Saison J, Demaret J, Venet F, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> assessment as a surrogate phenotype for FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in HIV-1 infected viremic and aviremic subjects [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013, 84(1): 50-54.
- [3] Sun Q, Zhang Q, Xiao H, et al. Significance of the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T-cells in patients with pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus [J]. *Respirology*, 2012, 17(5): 876-882.
- [4] Zhang HY, Liu ZD, Hu CJ, et al. Up-regulation of TGF-β1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic fatigue syndrome [J]. *J Formos Med Assoc*, 2011, 110(11): 701-704.
- [5] Burrell BE, Nakayama Y, Xu J, et al. Regulatory T cell induction, migration, and function in transplantation [J]. *J Immunol*, 2012, 189(10): 4705-4711.
- [6] Whiteside TL, Schuler P, Schilling B. Induced and natural regulatory T cells in human cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(10): 1383-1397.
- [7] Islam SK, Hossain KJ, Kamal M, et al. Serum immunoglobulins and white blood cells status of drug addicts; influence of illicit drugs and sex habit [J]. *Addict Biol*, 2004, 9(1): 27-33.
- [8] Azarang A, Mahmoodi M, Rajabalian S, et al. T-helper 1 and 2 serum cytokine assay in chronic opioid addicts [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2007, 18(4): 210-214.
- [9] Weber RJ, Gomez-Flores R, Smith JE, et al. Neuronal adaptations, neuroendocrine and immune correlates of heroin self-administration [J]. *Brain Behav Immun*, 2009, 23(7): 993-1002.
- [10] Lan Q, Fan H, Quesniaux V, et al. Induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: a potential new weapon to treat autoimmune and inflammatory diseases [J]. *J Mol Cell Biol*, 2012, 4(1): 22-28.
- [11] 刘徽婷, 王嘉军. 海洛因依赖者急性戒断前后 IL-1β、TNF-α、ACTH 及 CORT 含量变化的研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(3): 274-275.
- [12] Jamali A, Soleimanjahi H, Moin M, et al. Withdrawal from morphine reduces cell-mediated immunity against herpes simplex virus generated by natural immunization [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2012, 19(4): 229-234.
- [13] Busse A, Asemissen A, Nonnenmacher A, et al. Systemic immune tuning in renal cell carcinoma: favorable prognostic impact of TGF-β1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells [J]. *J Immunother*, 2011, 34(1): 113-119.
- [14] 洪建国, 董文芳, 周小建. 生长因子 β1 对儿童哮喘的作用及孟鲁司特钠对其影响 [J]. *中华儿科杂志*, 2011, 49(9): 679-684.
- [15] Wu H, Li P, Shao N, et al. Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF-β in acute myeloid leukemia [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(5): 1119-1123.
- [16] Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, et al. Soluble and membrane-bound TGF-β-mediated regulation of intratumoral T cell differentiation and function in B-Cell non-hodgkin lymphoma [J/OA]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e59456.
- [17] 何军, 左丽. 海洛因依赖者血清中 TGF-β1 水平的研究 [J]. *现代免疫学*, 2011, 31(1): 76-78.

(上接 1071 页)

#### 参考文献:

- [1] Chang PH, Chuang SK, Tsang T, et al. Cutaneous injury and *Vibrio vulnificus* infection [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(8): 1302-1303.
- [2] 宋曼丹, 严纪文, 朱海明, 等. 贝甲类海产品中创伤弧菌检验方法的探讨 [J]. *华南预防科学*, 2012, 38(1): 70-72.
- [3] 邢丽萍. 创伤弧菌生物学研究进展 [J]. *中国卫生检验*, 2011, 21(7): 1833-1835.
- [4] 薛超波, 许镇坚, 黄朱梁, 等. 环介导等温扩增技术检测创伤弧菌方法的建立与应用 [J]. *食品科学*, 2012, 33(20): 262-264.
- [5] 徐义刚, 李苏龙, 杨君宏, 等. 水产品中创伤弧菌 DNA 环介导恒温扩增快速检测方法的建立及初步应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(6): 96-102.
- [6] 张晶, 周勇, 陶震, 等. 创伤弧菌 PMA RTI-PCR 检测技术的建立 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(1): 54-58.
- [7] 付凯飞, 马聪, 郭建巍, 等. 抗创伤弧菌单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立及特性鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(3): 279-281.
- [8] Mani A, Falconi T, Campana R. Detection of environmental *Vibrio parahaemolyticus* using a polyclonal antibody by flow cytometry [J]. *Environ Microbiol Rep*, 2010, 2(1): 158-165.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T(金冬雁, 等译). 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2000: 880-887.
- [10] 北欧食品分析委员会. 食品中创伤弧菌的检测方法 [S]. MNKL NO.156 2nd ed, 1997.
- [11] Chen YC, Chang CC, Chang SY, et al. A recombinant metalloprotease antigen of *Vibrio vulnificus* elicits protective antibodies in a murine model [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 50(2): 168-172.
- [12] 马振宁, 郑磊, 林海美, 等. 抗 OmpW 单克隆抗体的制备与特性鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(9): 982-984.
- [13] 严智敏, 郑晶, 陈清, 等. 创伤弧菌快速检测试纸条的研制 [J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(5): 894-896.
- [14] Datta S, Janes ME, Simonson JG. Immunomagnetic separation and coagglutination of *Vibrio parahaemolyticus* with anti-flagellar protein monoclonal antibody [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(10): 1541-1546.
- [15] 陈钢, 赖卫华, 段霞, 等. 单增李斯特菌鞭毛蛋白提取方法的研究 [J]. *食品科学*, 2009, 30(23): 262-265.
- [16] Jadeja R, Janes ME, Simonson JG. Immunomagnetic separation of *Vibrio vulnificus* with anti-flagellar monoclonal antibody [J]. *J Food Prot*, 2010, 73(7): 1288-1293.
- [17] 王路梅, 杨晋川, 郭惠, 等. 荧光 PCR 与免疫磁珠技术相结合用于霍乱弧菌的检索 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(7): 1807-1808.
- [18] 张东方, 袁飞, 王博, 等. 免疫磁捕获-实时荧光 PCR 快速检测鸡肉中沙门氏菌 [J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(8): 142-146.