

一种基于流式细胞术的牛多细胞因子检测方法

朱兆成¹, 夏爱鸿¹, 曹兆立², 李昕², 陈祥^{1,2*}, 徐正中^{1,2*}, 焦新安^{1,2}

1 扬州大学 江苏省人兽共患病学重点实验室/江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009

2 扬州大学 农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室, 江苏扬州 225009

朱兆成, 夏爱鸿, 曹兆立, 李昕, 陈祥, 徐正中, 焦新安. 一种基于流式细胞术的牛多细胞因子检测方法[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 347-358.

ZHU Zhaocheng, XIA Aihong, CAO Zhaoli, LI Xin, CHEN Xiang, XU Zhengzhong, JIAO Xin'an. Development of a flow cytometry method for detection of bovine multi-cytokines[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 347-358.

摘要: 本研究旨在建立一种基于流式细胞术的牛多细胞因子检测方法。对前期制备并筛选出的针对牛细胞因子 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、IP-10 和 MCP-1 的单克隆抗体进行荧光标记, 与细胞表面分子抗体组合搭配, 进行牛多细胞因子流式检测方法的建立和优化。随后利用建立的方法进行 BCG 体外感染牛外周血单个核细胞的细胞因子表达规律测定, 并结合 CFP10-ESAT6 蛋白刺激剂评价上述细胞因子作为牛结核诊断标识的潜力。建立的牛多细胞因子流式检测方法可以有效测定 BCG 感染牛外周血 T 淋巴细胞的细胞因子表达, 其中 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 在感染 40 h 后持续上升, 而 IP-10 和 MCP-1 表达水平呈现下降趋势; 对于牛外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 的联合检测能有效区分牛结核阳性和阴性样品。这一方法为牛病原菌感染、疫苗注射后细胞免疫应答水平评价以及疫病诊断提供了重要技术手段。

关键词: 牛细胞因子; 胞内染色; 流式细胞术; 细胞免疫应答; 疫病诊断

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1800403); 江苏省自然科学基金(BK20201432); 江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(21)1004); 江苏省重点研发计划(现代农业)(BE2021331); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800403), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20201432), the Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (CX(21)1004), the Key Research and Development Program (Modern Agriculture) Project of Jiangsu Province (BE2021331), and the Priority Academic Development Program of Jiangsu Higher Education Institutions (PADP).

*Corresponding authors. E-mail: XU Zhengzhong, zzzxu@yzu.edu.cn; CHEN Xiang, chenxiang@yzu.edu.cn

Received: 2022-04-06; Accepted: 2022-06-22; Published online: 2022-06-24

Development of a flow cytometry method for detection of bovine multi-cytokines

ZHU Zhaocheng¹, XIA Aihong¹, CAO Zhaoli², LI Xin², CHEN Xiang^{1,2*}, XU Zhengzhong^{1,2*}, JIAO Xin'an^{1,2}

1 Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis/Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: This study aims to develop a method to detect bovine multi-cytokines based on flow cytometry. Previously we have prepared and screened monoclonal antibodies against bovine cytokines IFN- γ , IL-2, TNF- α , IP-10 and MCP-1. These bovine cytokine monoclonal antibodies were fluorescently labeled, and the combination of antibody and cell surface molecules were used to develop the method for detecting bovine multi-cytokines. Subsequently, the developed method was used to determine the cytokine expression profile of *Mycobacterium bovis* BCG infected bovine peripheral blood mononuclear cells *in vitro*, and evaluate the cytokine expression level of peripheral blood CD4⁺ T cells of tuberculosis-positive cattle. The bovine multi-cytokine flow cytometry detection method can effectively determine the cytokine expression of BCG-infected bovine peripheral blood T lymphocytes. Among them, the expression levels of IFN- γ , IL-2, and TNF- α continue to increase after 40 hours of infection, while the expression levels of IP-10 and MCP-1 decreased. The combined detection of IFN- γ , IL-2, and TNF- α on CD4⁺ T lymphocytes in peripheral blood of cattle can effectively distinguish tuberculosis-positive and tuberculosis-negative samples. This method may facilitate evaluating the level of cellular immune response after bovine pathogen infection and vaccine injection.

Keywords: bovine cytokine; intracellular staining; flow cytometry; cellular immune response; disease diagnosis

我国为奶牛养殖大国, 据统计, 2020 年全国奶牛存栏数达到 615 万头。但是, 近年来人兽共患胞内菌(如牛分枝杆菌、牛布鲁菌等)严重危害我国奶牛养殖业的健康发展和食品安全, 其感染具有病程长、临床表现复杂和全身系统受累等特点^[1-2]。目前, 在牛疫病防控中, 主要通过抗体水平测定来评价疫苗注射后的免疫水平以及疫病的检疫诊断。长期以来, 牛细胞免疫检测试剂和技术的匮乏, 以及基于牛细胞免

疫防控技术及产品的短缺, 严重制约了我国牛养殖业中人兽共患胞内细菌病的防控成效。

胞内菌感染后主要诱导机体产生 Th1 型细胞免疫应答, 而细胞因子作为细胞免疫状态的重要指标, 其免疫学检测显得尤为重要。目前细胞因子的免疫学检测方法被广泛地应用于基础研究和临床医学、疫苗免疫效果评估、疾病诊断和过敏反应研究等, 针对牛细胞因子的检测方法主要是酶联免疫吸附实验(enzyme linked

immunosorbent assay, ELISA)、酶联免疫斑点实验(enzyme linked immunospot assay, ELISPOT)法等,其中 ELISA 方法是群体水平的检测,只能检测单种细胞因子,对多细胞因子进行同时检测需要大量液体样本^[3]; ELISPOT 方法是单细胞水平检测,但是不能区分不同 T 淋巴细胞亚群应答水平^[4];而流式细胞术(flow cytometry, FCM)可以对牛细胞因子进行多因子、高通量及不同细胞亚群的精准分析。目前一些报道通过建立基于牛 IL-2^[5]、IFN- γ ^[6]的单细胞因子 FCM 检测技术,并结合特异性诊断抗原 ESAT-6、CFP-10 等进行牛结核等疫病的诊断。但是与人和小鼠相比,商品化牛细胞因子抗体种类较少,而且进行多因子分析时需要不同荧光染料搭配,因此基于流式细胞术的牛多色细胞因子检测技术的发展受到了极大地限制。

针对以上现状,本研究基于前期实验室制备的牛 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、IP-10 和 MCP-1 共 5 种细胞因子单抗^[7-11],基于胞内染色技术建立了牛多色细胞因子 FCM 检测方法,与传统 ELISA、ELISPOT 等牛细胞因子检测技术相比,该方法能够从单细胞水平,多因子、高通量检测胞内细胞因子表达情况,并且对特定 T 细胞类群的应答水平进行精准分析,为牛疫苗免疫效果评价和疫病诊断提供了一种有效手段。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

鼠抗牛 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、IP-10、MCP-1 单抗由本实验室制备保存;鼠抗牛 CD4、CD8 分子单抗, Bio-Rad 公司;BCG 疫苗株和 S19 疫苗株均由本实验室保存;ESAT-6/CFP-10 蛋白由本实验室制备;Concanavalin A from canavalia ensiformis (ConA), Sigma 公司;Fixation Buffer、Intracellular staining Permeabilization Wash

Buffer (10 \times)和 Brefeldin A, Biolegend 公司;BOVIGAM[®] *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for Cattle, Invitrogen 公司;rProtein A Sepharose 亲和层析柱, GE 公司;Alexa Fluor[®] 568、Alexa Fluor[®] 647、Alexa Fluor[®] 680、FITC、PE 荧光抗体标记试剂盒, Invitrogen 公司;牛 IFN- γ ELISPOT 试剂盒, Mabtech 公司。

1.2 单抗荧光标记和鉴定

前期研究通过鉴定筛选出效价高、与天然抗原亲和力好的牛 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、IP-10、MCP-1 单克隆抗体各 1 株,将单抗腹水使用 rProtein A Sepharose 亲和层析柱纯化后,再采用荧光标记试剂盒对上述牛细胞因子单抗进行荧光标记(表 1),具体方法参照说明书。

1.3 牛多细胞因子流式检测方法的建立

无菌采集健康牛尾静脉血,使用淋巴细胞分离管制备牛外周血单核细胞,活细胞计数后备用;将牛外周血单核细胞铺入 24 孔板中,1 \times 10⁶ 细胞/mL,1 mL/孔;设置实验组和对照组,在实验组的孔中加入非特异性刺激剂 ConA, 10 μ g/mL;置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱孵育,4 h 后加入阻断剂 BFA,继续孵育培养 16-24 h;使用 APC-Cy7 标记鼠抗牛 CD4 分子和/或 FITC 标记鼠抗牛 CD8 分子单抗避光染色 20 min;加入固定剂后,以破膜剂为稀释液,同时加入荧光标记牛 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、IP-10、MCP-1

表 1 荧光标记牛细胞因子单抗

Table 1 Fluorescent labelled mAbs against bovine cytokines

Cytokines	Number	Fluorochrome
IFN- γ	2G5	PE
IL-2	6D7	Alexa Fluor [®] 647
IP-10	2D5	FITC
MCP-1	4G9	Alexa Fluor [®] 680
TNF- α	3C1	Alexa Fluor [®] 568

单抗进行胞内染色, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 洗涤后使用流式细胞仪(LSRFortessa, BD 公司)进行检测。

1.4 牛分枝杆菌 BCG 体外感染牛外周血单个核细胞诱导细胞因子表达规律测定

制备牛外周血单核细胞, 将牛外周血单核细胞铺入 24 孔板中, 1×10^6 细胞/ mL , 1 $\text{mL}/\text{孔}$ 。分别设定实验组和对照组(每个样品设定 3 个重复孔), 实验组以 MOI 10 剂量加入牛分枝杆菌 BCG 感染牛外周血单核细胞, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱感染不同时间(0、12、24、36 和 48 h), 参照上述 1.3 方法检测 BCG 体外感染牛细胞因子表达规律。

1.5 牛细胞因子流式检测方法与 ELISPOT 方法的比较

选取 10 头健康奶牛, 采集尾静脉血, 制备牛外周血单核细胞, 将牛外周血单核细胞铺入 24 孔板中, 1×10^6 细胞/ mL , 1 $\text{mL}/\text{孔}$; 参照上述 1.3 方法, 进行刺激培养, 使用 APC-Cy7 标记鼠抗牛 CD4 分子单抗避光染色 20 min; 加入固定剂后, 以破膜剂为稀释液, 并使用荧光标记牛 IFN- γ 单抗进行胞内染色, 对 CD4^+ T 细胞进行圈门分析 IFN- γ 阳性细胞(设定 5 000 个细胞), 洗涤后上机进行检测。同时使用牛 IFN- γ 捕获抗体包被 96 孔滤膜板, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 无菌过夜包被; 使用含 10% 胎牛血清的完全 1640 培养基进行孵育封闭 2 h; 弃封闭液后, 96 孔滤膜板中加入刺激剂 ConA, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并设立对照组; 每孔加入牛外周血单个核细胞悬液, 2.5×10^5 细胞/孔, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 48 h; 洗板 5 次, 加入稀释的牛 IFN- γ 检测抗体, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h; 洗板 3 次, 加入 1:1 000 稀释的亲合素-碱性磷酸酶结合物, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h; 每孔加入 100 μL 底物液 BCIP/NBT, 放置于室温避光显色, 终止反应后使用 ELISPOT 仪进行扫描计数和分析。

1.6 结核阳性牛外周血 CD4^+ T 细胞的细胞因子表达水平分析

从某牛场分别选取 6 头结核阳性牛和 9 头结核阴性牛(使用皮试变态反应试验、商品化 BOVIGAM[®]牛结核 γ -干扰素 ELISA 检测试剂盒进行了同步检测), 采集尾静脉血, 制备牛外周血单核细胞, 将牛外周血单核细胞铺入 24 孔板中, 1×10^6 细胞/ mL , 1 $\text{mL}/\text{孔}$ 。以结核分枝杆菌特异性重组蛋白 ESAT-6/CFP-10 为刺激原, 20 $\mu\text{g}/\text{孔}$, 以未刺激组为对照, 参照上述 1.3 方法检测结核阳性牛细胞因子表达水平。

1.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5.0 软件处理并绘制线型图。2 组间比较采用双侧 t 检验; 2 组以上数据比较采用单因素方差分析(ANOVA), 并用 Tukey's 多重比较检验进行两两比较。 P 值小于 0.05 被认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 牛多细胞因子流式检测方法的建立

本研究采取了 2 种检测方案, 方案一的检测流程及结果如图 1 所示, 首先圈定牛外周血单个核细胞中的淋巴细胞群, 然后圈取非粘连细胞单细胞, 之后圈取 CD4^+ T 细胞, 最后对 IFN- γ 、IL-2、IP-10、MCP-1 和 TNF- α 这 5 种细胞因子进行检测分析。5 种细胞因子的单抗组合后均能够有效区分刺激组和非刺激组, 其刺激组检测值-未刺激组检测值分别为 4.810%、3.801%、0.153%、0.860%和 5.060%, 具有良好的检测效果。方案二的检测流程及结果如图 2 所示, 在本方案中首先圈定牛外周血单个核细胞中淋巴细胞群, 再去除粘连细胞, 之后再圈出 CD4^+ T 细胞和 CD8^+ T 细胞, 最后对 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 分别检测分析, 从图中可看出效

果良好。其中，CD4⁺ T 细胞中 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 刺激组-未刺激组的差值分别为 2.94%、4.521%和 5.438%，CD8⁺ T 细胞中 IFN- γ 、IL-2

和 TNF- α 刺激组-未刺激组的差值分别为 3.540%、0.300%和 4.054%，可明显区分刺激组和未刺激组。

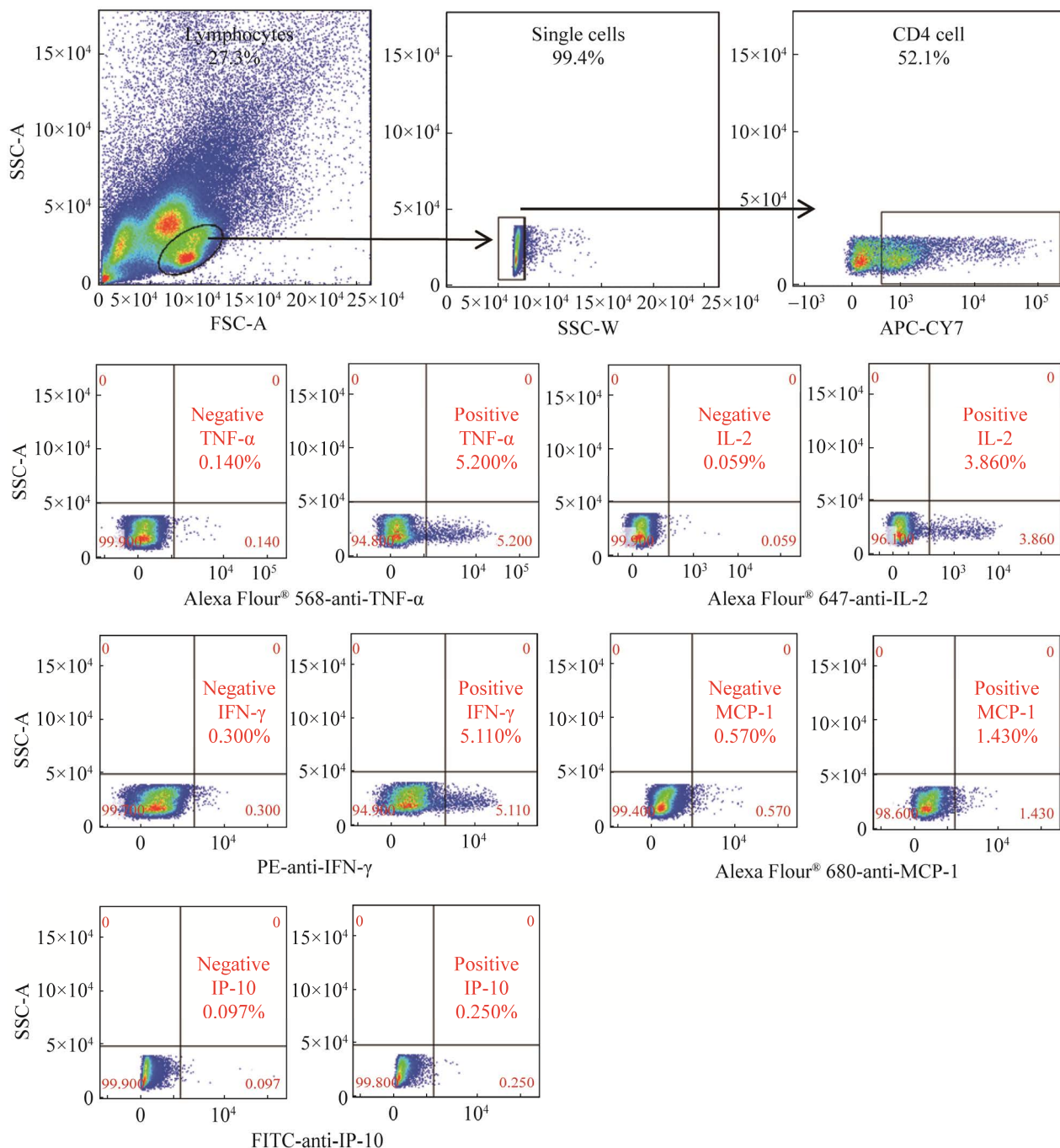


图 1 CD4⁺ T 细胞 IFN- γ 、IL-2、IP-10、MCP-1 和 TNF- α 的检测结果
Figure 1 Detection of IFN- γ , IL-2, IP-10, MCP-1 and TNF- α in CD4⁺ T cells.

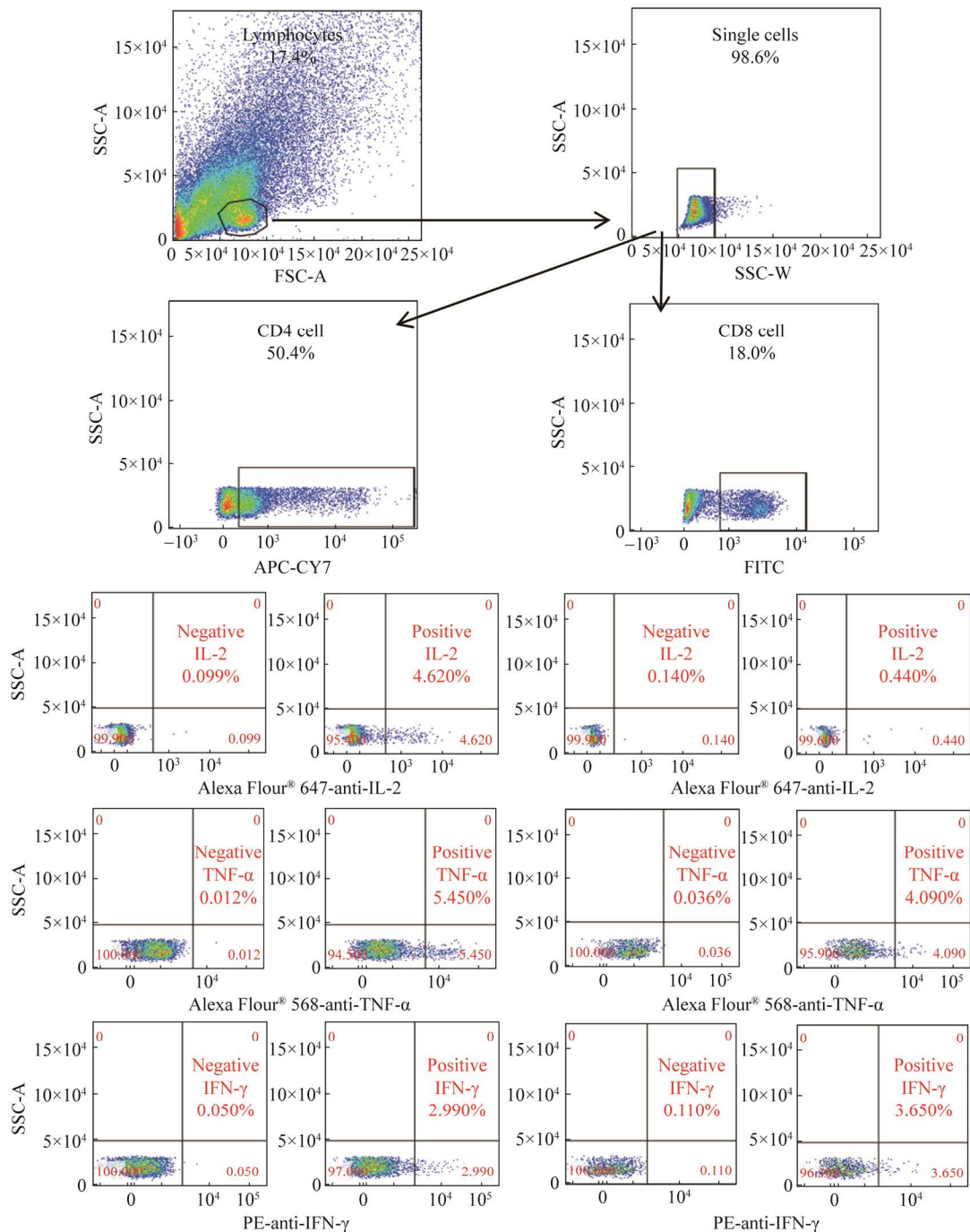


图2 CD4⁺和CD8⁺T细胞IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的检测结果

Figure 2 Detection of IFN- γ , IL-2 and TNF- α in CD4⁺T cells and CD8⁺T cells.

2.2 牛分枝杆菌BCG、布鲁菌S19感染体外诱导PBMC细胞因子表达规律测定

如图3所示,BCG疫苗株、S19疫苗株感染牛外周血单个核淋巴细胞后,细胞因子的表

达水平及规律大致相似,与BCG组相比有显著性差异(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)。BCG疫苗株诱导IP-10水平更高,S19疫苗株诱导MCP-1水平更高。在S19疫苗株感染后,IFN- γ 、IL-2和

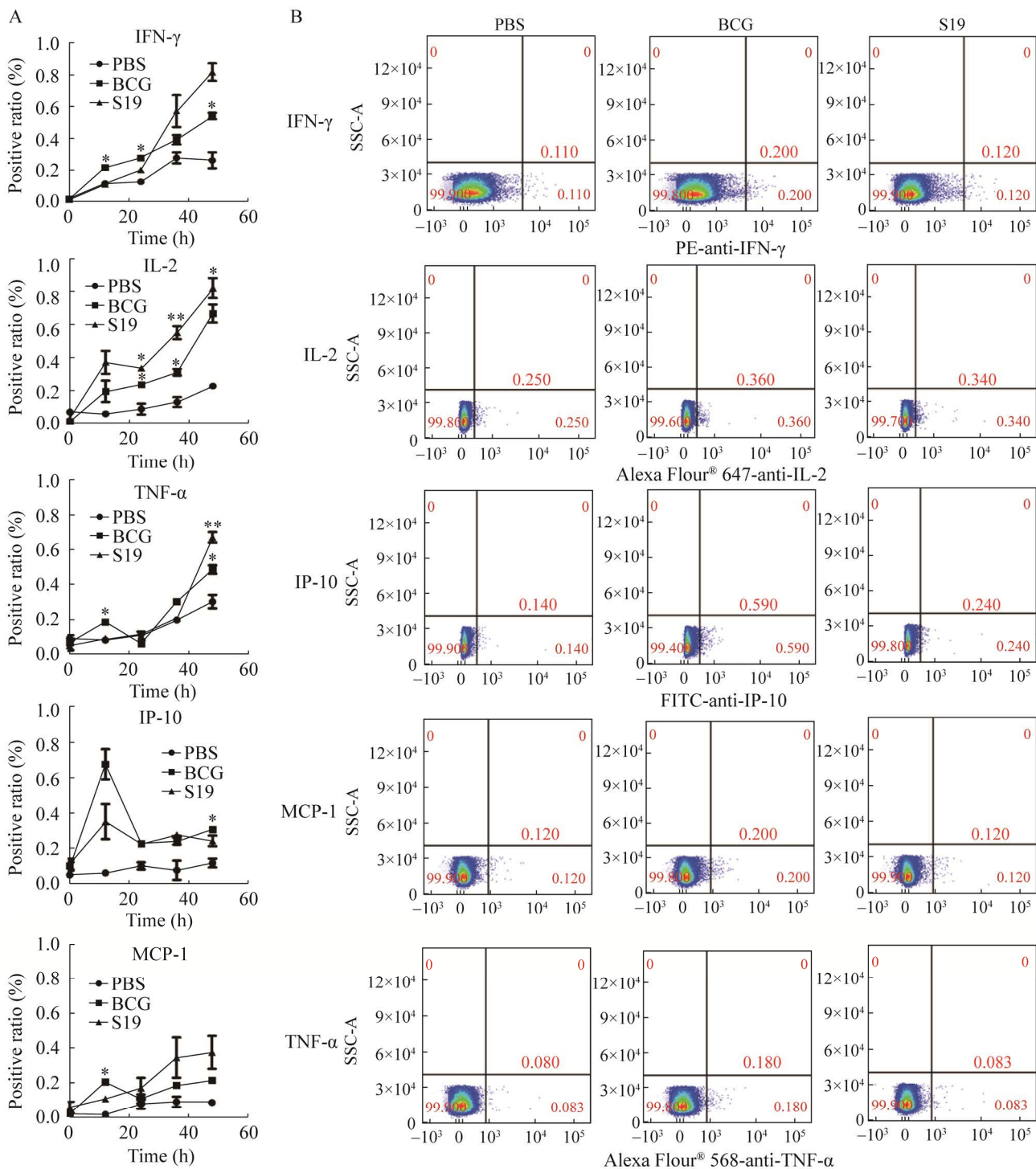


图3 BCG和S19体外感染PBMC细胞因子表达规律

Figure 3 Expression of cytokines in PBMC infected by BCG and S19 *in vitro*. A: Scatter plots of cytokines in PBMC infected by BCG and S19 *in vitro* after 12 h. B: Statistically significant differences between the BCG and PBS, S19 and PBS groups are indicated by the asterisks. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

TNF- α 的表达规律大致相同, 在感染 40 h 后持续上升; MCP-1 值呈现一种平缓上升的趋势; IP-10 的变化趋势与对照组相比, 在 12 h 时基本未变, 24 h 时急剧下降, 48 h 时又恢复到与对照组相当的水平。由于篇幅限制, 图 3 中只显示部分结果。

2.3 牛细胞因子流式检测方法与 ELISPOT 方法的比较结果

本研究选择 10 头健康奶牛制备外周血单核细胞, 使用 ConA 刺激细胞因子分泌, 以 PBS 组为对照, 分别采用建立的流式检测方法和 ELISPOT 方法进行检测, 对于两者的检出的阳性细胞占 PBMC 细胞总数的比例进行比较分析。结果如图 4 所示, 在 10 份样品中, 流式细胞检测方法阳性细胞占细胞总数的比例(刺激组和

对照组的检测比例差值)均在 0.5% 以上, 而 ELISPOT 方法的检测比例差值均低于 0.5%, 这表明流式检测方法具有更高的检测灵敏度。由于篇幅限制, 图 4 中只显示部分实验结果。

2.4 结核感染牛外周血 CD4⁺ T 细胞的细胞因子表达水平分析

使用上述建立的牛多细胞因子流式检测方法, 对 6 头已知结核阳性牛和 9 头已知结核阴性牛进行检测, 以结核分枝杆菌特异性重组蛋白 ESAT-6/CFP-10 为刺激原, 通过测定 CD4⁺ T 细胞的 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 分泌表达水平进行检测。结果如图 5 所示, 结核阳性牛 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 细胞因子的检测值普遍高于阴性样品, 具有较强的区分度。另外, 如表 2、表 3 和表 4 所示, TNF- α 分别与 IFN- γ 、IL-2 之间均

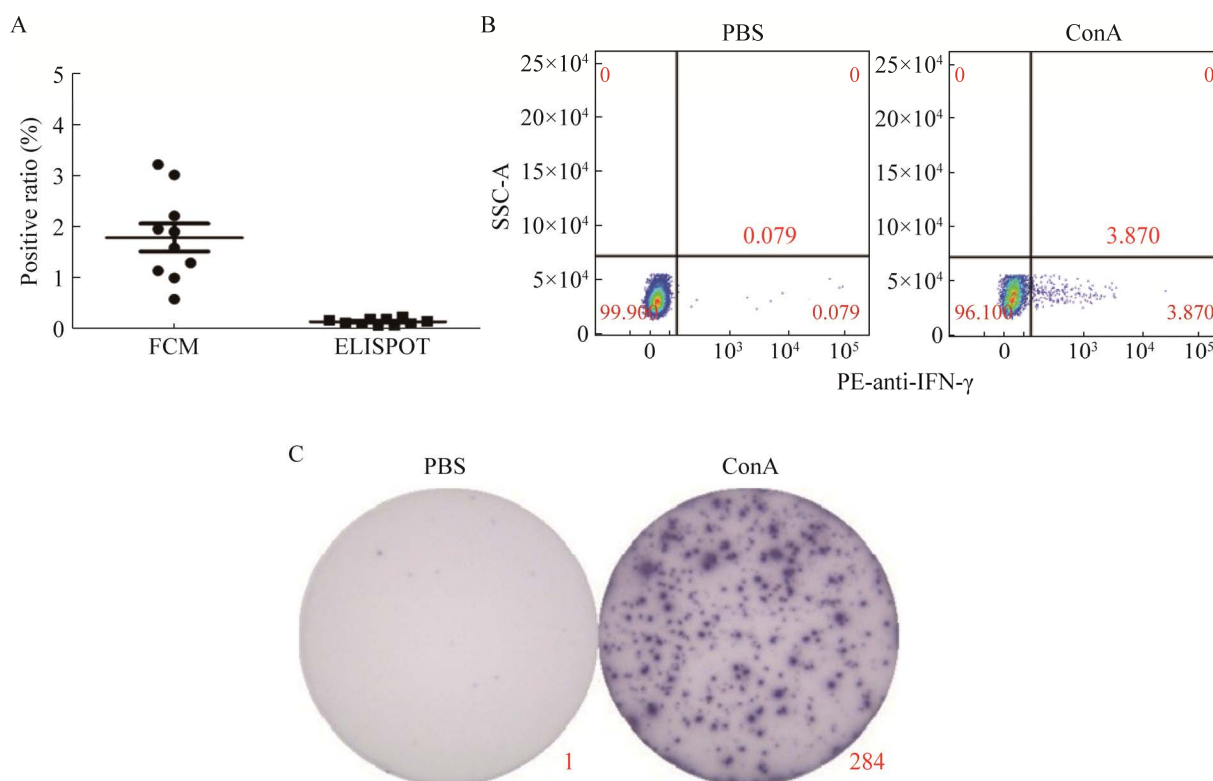


图 4 牛细胞因子流式检测方法和 ELISPOT 方法的结果比较

Figure 4 Comparison of flow cytometry method and ELISPOT method for detecting bovine cytokines. A: Results of all 10 cattles. B: FCM results of one cattle. C: ELISPOT results of one cattle.

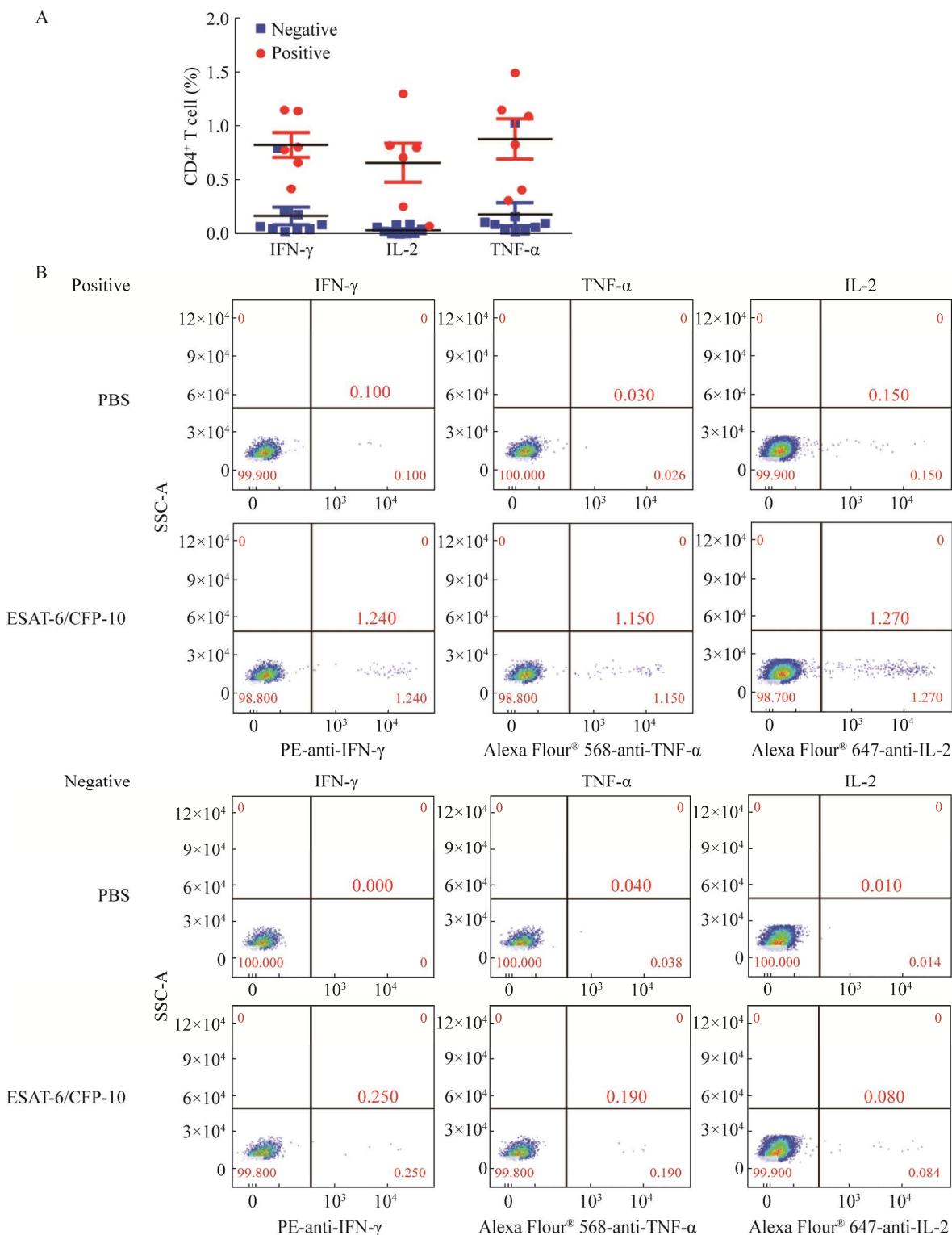


图 5 结核阳性/阴性牛 CD4⁺ T 细胞的细胞因子表达水平

Figure 5 Expression level of cytokines in CD4⁺ T cells in tuberculosis positive/negative cattle. A: Results of all 15 tuberculosis positive/negative cattles. B: Scatter plots of one tuberculosis positive bovine and one tuberculosis negative bovine.

表2 IL-2和TNF- α 的相关性分析Table 2 Correlation analysis of IL-2 and TNF- α

		TNF- α	IL-2
TNF- α	Pearson correlation	1	0.704**
	Sig. (2-tailed)	—	0.003
	N	15	15
IL-2	Pearson correlation	0.704**	1
	Sig. (2-tailed)	0.003	—
	N	15	15

**: $P<0.01$.表3 IFN- γ 和IL-2的相关性分析Table 3 Correlation analysis of IFN- γ and IL-2

		IFN- γ	IL-2
IFN- γ	Pearson correlation	1	0.596*
	Sig. (2-tailed)	—	0.019
	N	15	15
IL-2	Pearson correlation	0.596*	1
	Sig. (2-tailed)	0.019	—
	N	15	15

*: $P<0.05$.表4 IFN- γ 和TNF- α 的相关性分析Table 4 Correlation analysis of IFN- γ and TNF- α

		IFN- γ	TNF- α
IFN- γ	Pearson correlation	1	0.765**
	Sig. (2-tailed)	—	0.001
	N	15	15
TNF- α	Pearson correlation	0.765**	1
	Sig. (2-tailed)	0.001	—
	N	15	15

**: $P<0.01$.

呈现出显著性($P<0.01$),并且相关系数值均高于0.7,说明TNF- α 分别与IFN- γ 、IL-2之间均有着非常紧密的正向相关关系。IFN- γ 与IL-2之间也呈现出显著性($P<0.05$),相关系数值是0.596,这表明IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的联合流式细胞术检测对于牛结核病具有很高的诊断潜力。由于篇幅限制,图5中只显示部分实验结果。

3 讨论与结论

IFN- γ 主要是由活化的CD4⁺ Th1细胞、CD8⁺ T细胞及NK细胞等产生的细胞因子,具有广泛抗病毒、抗肿瘤活性以及免疫调节功能,而牛IFN- γ 是牛结核病细胞免疫诊断方法的重要标识^[12];IL-2主要是由T淋巴细胞分泌的一种淋巴因子,在T细胞增殖、NK细胞的活化等方面起重要作用,而牛IL-2与牛白血病病毒感染相关^[13],并被认为具有作为牛结核诊断标识的潜力^[14];TNF- α 是一种涉及到系统性炎症的细胞因子,主要由活化的巨噬细胞、NK细胞及T淋巴细胞产生,牛疱疹病毒感染^[15]以及牛乳腺炎^[16]、牛传染性胸膜肺炎^[17]中TNF- α 均表达上调;IP-10是单核细胞经细胞因子刺激后分泌的趋化因子,可选择性地募集T淋巴细胞、自然杀伤细胞和单核细胞到损伤部位,发挥宿主免疫防护作用,有研究显示IP-10和IFN- γ 释放之间存在很强相关性^[18],在牛分枝杆菌感染29d后,牛PBMC中的抗原特异性IP-10 mRNA水平与IFN- γ mRNA水平高度相关^[19],两者的平行测量能增强对牛分枝杆菌感染的牛和水牛的检测的潜力;MCP-1主要趋化单核细胞,使各种炎性细胞尤其是单核细胞向病变部位聚集,从而在机体防御、慢性炎症及抗肿瘤等方面起重要作用。

目前一些商品化荧光标记牛细胞因子单抗,但是无法进行荧光染料的搭配,限制了牛多色流式细胞术的发展。本研究通过对牛细胞因子抗体的筛选、染色、组合,建立了一套能够同时检测多种牛细胞因子的检测方法。其中,A方案中主要是检测CD4细胞中IFN- γ 、IL-2、IP-10、MCP-1和TNF- α 的含量,适用于高通量多种细胞因子检测,有效地节约了时间,提高了效率。此前也有研究人员利用微球偶联带有荧光染料抗体^[20],检测细胞培养上清液中的多种牛细胞因子,与本研究相比,其只可检测分泌到细胞外的细胞因

子,具有一定的局限性。B 方案中是分别检测 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞中的 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 细胞因子含量,该方案在检测细胞因子的同时还检测出分泌细胞的亚型,有助于牛疫病诊断的研究。Whelan 等采用了类似的方法探究了犊牛在感染牛分枝杆菌后,CD4⁺ T 细胞中 IL-2 的变化与关系^[21]。本研究初步探究了 BCG 疫苗株、S19 疫苗株感染牛外周血单个核淋巴细胞后,细胞因子的表达水平及其规律,然而体外检测只能表现出牛淋巴细胞的细胞因子表达状况,无法表现疫苗接种后体内复杂系统的细胞因子表达状况,这对于疾病研究的意义有限,还需要进一步进行实验研究。已有研究发现接种 BCG 的犊牛在感染牛分枝杆菌后,与未接种牛相比,其细胞内产生了更为强烈的 IFN- γ ⁺、TNF- α ⁺、IL-2⁺反应和较低的 IFN- γ ⁺、TNF- α ⁺反应,研究者认为 IFN- γ ⁺、TNF- α ⁺细胞是由牛分枝杆菌感染而产生的应答,而 IFN- γ ⁺、TNF- α ⁺、IL-2⁺细胞则是 BCG 接种后对于机体的保护性反应^[22]。此外,还对 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 这 3 种细胞因子的在牛结核病中的相关性进行分析,结果表明这 3 种细胞因子之间有着紧密的正向相关关系。此外,干扰素蛋白的网络分析表明,免疫相关蛋白(白细胞介素、组织坏死因子)和干扰素受体之间存在很强的关联^[23]。在人结核病检测中^[24-25],IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 具有作为结核感染生物学标志的潜在价值,结合本研究结果表明 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 的联合流式检测在牛结核病的诊断中也具有很高的应用潜力。

REFERENCES

- [1] 郭爱珍. 牛结核病的流行与防控技术[J]. 兽医导刊, 2012(11): 41-43.
GUO AZ. Epidemic and control technology of bovine tuberculosis[J]. Veterinary Orientation, 2012(11): 41-43 (in Chinese).
- [2] 翠芳. 牛布鲁菌病的综合防控[J]. 兽医导刊, 2017(5): 63-64.
- [3] CUI F. Comprehensive prevention and control of bovine brucellosis[J]. Veterinary Orientation, 2017(5): 63-64 (in Chinese).
- [3] WOOD PR, CORNER LA, PLACKETT P. Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of γ interferon[J]. Research in Veterinary Science, 1990, 49(1): 46-49.
- [4] PARTHASARATHY S, VEERASAMI M, APPANA G, CHANDRAN D, DAS D, SRINIVASAN VA. Use of ESAT-6-CFP-10 fusion protein in the bovine interferon-gamma ELISPOT assay for diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 90(3): 298-304.
- [5] XIA AH, XU ZZ, HU T, LI X, ZHU ZC, CHEN X, JIAO XN. Development of a flow cytometry assay for bovine interleukin-2 and its preliminary application in bovine tuberculosis detection[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2020, 228: 110112.
- [6] ELNAGGAR MM, ABDELLRAZEQ GS, SESTER M, KHALIEL SA, SINGH M, TORKY HA, DAVIS WC. Development of an improved ESAT-6 and CFP-10 peptide-based cytokine flow cytometric assay for bovine tuberculosis[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2015, 42: 1-7.
- [7] 单锋丽. 牛 γ 干扰素单克隆抗体的制备与鉴定[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2012.
SHAN FL. Development and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine interferon-gamma[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2012 (in Chinese).
- [8] 徐正中, 沈轩云, 朱兆成, 夏爱鸿, 陈祥, 焦新安. 牛干扰素诱导蛋白-10 单克隆抗体的制备及其流式检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(9): 959-964.
XU ZZ, SHEN XY, ZHU ZC, XIA AH, CHEN X, JIAO XA. Preparation of monoclonal antibody against bovine interferon-inducible protein-10 and establishment of detection method based on flow cytometry[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2021, 43(9): 959-964 (in Chinese).
- [9] 谈悦, 徐正中, 朱兆成, 夏爱鸿, 孙林, 陈祥, 焦新安. 牛肿瘤坏死因子 α 小鼠单克隆抗体的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(3): 271-276.
TAN Y, XU ZZ, ZHU ZC, XIA AH, SUN L, CHEN X, JIAO XA. Preparation of mouse monoclonal antibodies against bovine TNF-A[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2019, 35(3): 271-276 (in Chinese).

- [10] 胡婷. 牛白细胞介素-2 和牛分枝杆菌 Ag85A 单克隆抗体的制备与鉴定[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2015.
HU T. Development and identification of monoclonal antibodies against BoIL-2 and Ag85A protein of *Mycobacterium bovis*[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2015 (in Chinese).
- [11] 刘泽. 牛单核细胞趋化蛋白 1 单克隆抗体的制备及其初步应用[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2017.
LIU Z. Preparation and preliminary application of monoclonal antibodies specific for bovine MCP-1[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2017 (in Chinese).
- [12] WOOD PR, JONES SL. BOVIGAM™: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis[J]. Tuberculosis, 2001, 81(1/2): 147-155.
- [13] AMILLS M, RAMIYA V, NORIMINE J, OLMSTEAD CA, LEWIN HA. Reduced IL-2 and IL-4 mRNA expression in CD4⁺ T cells from bovine leukemia virus-infected cows with persistent lymphocytosis[J]. Virology, 2002, 304(1): 1-9.
- [14] STEINBACH S, VORDERMEIER HM, JONES GJ. Potential of the dual IFN- γ /IL-2 fluorescence-immunospot assay to distinguish different stages in bovine tuberculosis[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2019, 217: 109930.
- [15] CHANROT M, BLOMQVIST G, GUO YZ, ULLMAN K, JUREMALM M, BAGE R, DONOFRIO G, VALARCHER JF, HUMBLOT P. Bovine herpes virus type 4 alters TNF- α and IL-8 profiles and impairs the survival of bovine endometrial epithelial cells[J]. Reproductive Biology, 2017, 17(3): 225-232.
- [16] AKHTAR M, GUO S, GUO YF, ZAHOR A, SHAUKAT A, CHEN Y, UMAR T, DENG PG, GUO MY. Upregulated-gene expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) via TLRs following NF- κ B and MAPKs in bovine mastitis[J]. Acta Tropica, 2020, 207: 105458.
- [17] STERNER-KOCK A, HAIDER W, SACCHINI F, LILJANDER A, MEENS J, POOLE J, GUSCHLBAUER M, HELLER M, NAESSENS J, JORES J. Morphological characterization and immunohistochemical detection of the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-17A, and TNF- α in lung lesions associated with contagious bovine pleuropneumonia[J]. Tropical Animal Health and Production, 2016, 48(3): 569-576.
- [18] PARSONS SDC, MCGILL K, DOYLE MB, GOOSEN WJ, VAN HELDEN PD, GORMLEY E. Antigen-specific IP-10 release is a sensitive biomarker of *Mycobacterium bovis* infection in cattle[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155440.
- [19] WATERS WR, THACKER TC, NONNECKE BJ, PALMER MV, SCHILLER I, OESCH B, VORDERMEIER HM, SILVA E, ESTES DM. Evaluation of gamma interferon (IFN- γ)-induced protein 10 responses for detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*: comparisons to IFN- γ responses[J]. Clinical and Vaccine Immunology: CVI, 2012, 19(3): 346-351.
- [20] RODRIGUES V, BAUDIER JB, CHANTAL I. Development of a bead-based multiplexed assay for simultaneous quantification of five bovine cytokines by flow cytometry[J]. Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology, 2017, 91(9): 901-907.
- [21] WHELAN AO, VILLARREAL-RAMOS B, VORDERMEIER HM, HOGARTH PJ. Development of an antibody to bovine IL-2 reveals multifunctional CD4⁺ T (EM) cells in cattle naturally infected with bovine tuberculosis[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29194.
- [22] MAGGIOLI MF, PALMER MV, THACKER TC, VORDERMEIER HM, MCGILL JL, WHELAN AO, LARSEN MH, JACOBS WR JR, WATERS WR. Increased TNF- α /IFN- γ /IL-2 and decreased TNF- α /IFN- γ production by central memory T cells are associated with protective responses against bovine tuberculosis following BCG vaccination[J]. Frontiers in Immunology, 2016, 7: 421.
- [23] BOGGIATTO PM, KANIPE CR, PALMER MV. Enhanced detection of *Mycobacterium bovis*-specific T cells in experimentally-infected cattle[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 676710.
- [24] SARGENTINI V, MARIOTTI S, CARRARA S, GAGLIARDI MC, TELONI R, GOLETTI D, NISINI R. Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis[J]. BMC Infectious Diseases, 2009, 9: 99.
- [25] HARARI A, ROZOT V, ENDERS FB, PERREAU M, STALDER JM, NICOD LP, CAVASSINI M, CALANDRA T, BLANCHET CL, JATON K, FAOUZI M, DAY CL, HANEKOM WA, BART PA, PANTALEO G. Dominant TNF- α ⁺ *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4⁺ T cell responses discriminate between latent infection and active disease[J]. Nature Medicine, 2011, 17(3): 372-376.

(本文责编 陈宏宇)