

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.01.04

IP-10 作为牛结核病诊断标志物的初步探究

高新桃^{1*}, 贾红¹, 杨宏军³, 朱良全², 郭晓宇¹, 侯邵华¹, 袁维峰¹,
朱鸿飞¹, 鑫婷^{1*}, 丁家波^{2*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 中国兽药药品监察所, 北京 100081;

3. 山东省农业科学院奶牛研究中心, 济南 250183)

[收稿日期] 2017-11-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 01-0019-08 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为评价细胞因子 IL-12 p40、IP-10 和 TNF- α 转录水平与牛分枝杆菌感染之间的关系, 及其在牛结核病诊断中的应用潜力。采集田间筛选的结核病阳性牛、结核病阴性牛以及牛分枝杆菌 68002 人工感染牛的外周血淋巴细胞, 经牛结核菌素 (PPDB)、重组蛋白 CFP-10-ESAT-6 (CE)、MPT63、PET 和 PBS 分别刺激 6 h, 提取细胞总 RNA, 用荧光定量 PCR 检测 IL-12 p40、IP-10、IFN- γ 和 TNF- α 的转录水平。结果显示结核病阳性牛的外周血淋巴细胞经 PPDB 和 CE 刺激后, 其 IP-10 的 mRNA 转录水平显著高于结核病阴性牛, 且与 IFN- γ 的 mRNA 转录水平具有良好的相关性; 初步建立牛结核病 IFN- γ 和 IP-10 的 Real-time PCR 检测方法, 其对临床阳性样本的检出率分别为 71.45% 和 78.57%。因此, IP-10 的 mRNA 转录水平与牛分枝杆菌的感染相关, 有作为牛结核病诊断标志物的潜力。

[关键词] 牛结核病; 诊断; IP-10; IFN- γ ; Real-Time PCR

Preliminary Research on the Potential of IP-10 as Biomarker of Bovine Tuberculosis

GAO Xin-tao^{1*}, JIA Hong¹, YANG Hong-jun³, ZHU Liang-quan², GUO Xiao-yu¹, HOU Shou-hua¹,
YUAN Wei-feng¹, ZHU Hong-fei¹, XIN Ting^{1*}, DING Jia-bo^{2*}

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 3. Dairy Cattle Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250183, China)

Corresponding author: XIN Ting, E-mail: xinting_xt@163.com; DING Jia-bo, E-mail: dingjiabo@126.com

Abstract: To evaluate the relationship between the mRNA transcription levels of IL-12 p40, IP-10 and TNF- α and the infection of *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), and the potential of these cytokines as biomarkers for the diagnosis of bovine tuberculosis (bTB), the peripheral blood lymphocyte (PBL) of bTB positive cattle, bTB

基金项目: 北京市自然科学基金 (6164039); 国家重点研发计划 (2016YFD0500902); 中国农业科学院科技创新工程 (ASTIO-IAS-11)

作者简介: 高新桃, 博士研究生, 从事动物疫苗与分子免疫学研究。

通讯作者: 鑫婷, E-mail: xinting_xt@163.com; 丁家波, E-mail: dingjiabo@126.com

negative cattle and *M. bovis* experimentally infected cattle were isolated respectively. The PBLC were stimulated by using PPDB, recombinant protein CFP-10-ESAT-6 (CE), MPT63, PET and PBS for 6 h, respectively. And then the total RNA were extracted and the mRNA transcription levels of IL-12 p40, IP-10, IFN- γ and TNF- α were detected by real-time PCR. The results showed the mRNA transcription levels of IP-10 of PBLC stimulated by PPDB or CE were significantly higher in bTB positive cattle than that in bTB negative cattle, and the mRNA transcription levels of IP-10 showed good correlation with IFN- γ . The bTB IFN- γ and IP-10 real-time PCR detection methods were preliminary established, and the detection rate on clinical bTB positive samples were 71.45% and 78.57% respectively. Therefore, the mRNA transcription levels of IP-10 were related with *M. bovis* infection, and potential as biomarker for the diagnosis of bTB.

Key words: bovine tuberculosis; diagnosis; IP-10; IFN- γ ; Real-Time PCR

牛结核病 (Bovine Tuberculosis) 是一种主要由结核分枝杆菌复合群 (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC) 成员—牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*, *M. bovis*) 感染引起的一种人兽共患慢性传染病^[1-2]。目前世界范围内的牛结核病疫情形势严峻, 约有 5000 万头牛感染了结核病, 造成的经济损失每年达 30 多亿美元, 野生动物带菌状况更是无法精确统计^[3], 我国牛结核病流行数据主要来自于零星报道: 2009~2014 年青海 23 个县市奶牛结核病平均阳性率 0.06%, 耗牛阳性率为 0.05%^[4]; 山东省 2010~2012 年牛结核病阳性率分别为 29.34%、27.96% 和 14.93%^[5]; 个别奶牛场结核病的阳性率为 10.18%^[6], 牛结核病给畜牧业带来巨大经济损失和贸易限制。该病能传染给人, 严重威胁人类健康。据调查, 2003 年结核病患者中约有 3.4% 是由牛分枝杆菌感染引起的, 2011 年则上升至 5.4%, 在墨西哥, 有 38% 的结核病患者是由牛分枝杆菌感染引起^[7]。因此, 牛结核病的有效检测和防控直接关系着公共卫生安全。目前, 世界上对牛结核病的诊断主要依赖于结核菌素皮试试验, 新西兰、美国、澳大利亚等发达国家也将 IFN- γ 释放试验推荐作为牛结核病的诊断方法。科研工作者仍在不断开发新的诊断方法和诊断试剂盒, 以期进一步提高牛结核病诊断方法的灵敏度和特异性, 降低检测成本, 简化检测步骤, 建立更加符合基层和检疫部门不同需求的牛结核病诊断方法。

在人结核病诊断方法的研究中发现, IP-10、

IL-12 和 TNF- α 等细胞因子与结核病的感染相关, 并有作为结核病分子标志物的潜力, 本研究主要通过采集并分离田间筛选的结核病阳性牛、阴性牛和牛分枝杆菌人工感染牛的外周血淋巴细胞, 利用 PPDB、CE、MPT63 等抗原刺激后, Real-Time PCR 检测 IL-12p40、IP-10、IFN- γ 和 TNF- α 的转录水平, 初步评价上述细胞因子与牛结核病的相关性, 并用建立的 real-time PCR 检测方法检测 14 头结核病阳性牛, 初步评价其对牛结核病的检出效果, 从而为进一步筛选牛结核病诊断标识提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料 牛分枝杆菌强毒参考株 68002 (CVCC68002) 来自国家兽医微生物菌种保藏中心。M-LV、Oligo dT(15) 购自 Promega 公司; TRIZOL 购于 Invitrogen 公司; dNTP、RI 购自 TAKARA 公司; RPMI1640 培养基购自 GIBCO 公司; 48 孔细胞培养板购自 Corning 公司; 牛淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物公司; Taqman 荧光定量试剂盒购自 ABI 公司; IFN- γ 释放试验用 PPDA (Prionics AG)、PPDB (Prionics AG) 和 BovigamTM 购自北京测迪公司; 皮试用 PPDB、PPDA 购买自哈尔滨第六生物制品厂; 重组蛋白 CFP-10/ESAT-6/TB10.4 (CET, 0.5 mg/mL)、pET-32a 载体标签蛋白 PET (20 μ g/mL)、CFP-10-ESAT-6 (CE, 20 μ g/mL) 和 MPT63 (20 μ g/mL) 由实验室制备并保存。

1.2 方法

1.2.1 皮试试验 结核菌素皮试试验 (Tuberculin

Skin Test, TST) 根据国家标准《动物结核病诊断技术》(GB/T 18645-2002) 进行操作其判定标准为: PPD-B 为检测原时, 局部有炎性反应, 皮厚差 ≥ 4 mm 为阳性反应; 无炎性反应, 皮厚差 < 2 mm 为阴性反应; 局部炎性反应不明显, $2 \leq$ 皮厚差 < 4 mm 需在检测结束后两个月后进行复检, 第二次检测皮厚差 ≥ 2 mm, 则判定为结核病阳性。

基于重组蛋白 CFP-10/ESAT-6/TB10.4 的皮试试验(CFP-10/ESAT-6/TB10.4-based skin test, CET-based ST) 为实验室建立。该方法操作步骤为在牛颈部一侧皮内注射 0.1 mL, 分别在注射前和注射后 72 h 由同一操作人员, 用游标卡尺测量注射部位皮肤厚度, 其判定标准为: 皮厚差 ≥ 1.1 mm 为结核病阳性, 皮厚差 < 1.1 mm 为结核病阴性。

1.2.2 IFN- γ 释放试验 采集实验动物全血置于 10 mL 肝素锂抗凝采血管中, 分装至 48 孔细胞培养板中 (750 μ L/孔, 5 孔/份样品), 无菌条件下分别加入 50 μ L 的 PPD-B、PPD-A、PBS、CE、MPT63 和 PET, 轻轻混匀后于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。6000 r/min 离心, 收集上清, 按照 BovigamTM 试剂盒说明书进行检测, 不同刺激原的 OD_{450nm} 值分别记作 OD_{PPDB}、OD_{PPDA}、OD_{PBS}、OD_{CE}、OD_{MPT63} 和 OD_{PET}。结果判定: PPD-B/PPD-A 作为刺激原时 (Interferon Gama Release Assay, IGRA), OD_{PPDB} - OD_{PPDA} < 0.1 , 或 OD_{PPDB} - OD_{PBS} < 0.1 , 判为阴性; OD_{PPDB} - OD_{PPDA} ≥ 0.1 且 OD_{PPDB} - OD_{PBS} ≥ 0.1 判定为牛结核病阳性。重组蛋白 CE 作为刺激原时 (CE-based IGRA), OD_{CE} - OD_{PBS} ≥ 0.1 判定为阳性; OD_{CE} - OD_{PBS} < 0.1 , 判为阴性。OD_{CE} - OD_{PBS} ≥ 0.1 判断为阳性。

1.2.3 牛外周血淋巴细胞的分离及刺激 经颈静脉采集全血放于肝素锂抗凝采血管中, 参照灏洋生物公司牛淋巴细胞分离液说明书操作, 分离外周血淋巴细胞 (PBLC), 加入 1 mL 红细胞裂解液, 轻轻吹悬后, 静置 3 min, 加入 10 mL 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基终止反应, 1000 r/min 离心 5 min, 倾去培养基, 再用 PBS 洗涤 2 次细胞。用 2 mL 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基重悬 PBLC, 以 2×10^6 cell/mL 浓度铺于 48 孔细胞培养板中 (200 μ L/孔, 6 孔/份样品)。分别向各个孔中加入

50 μ L 的 PPDB、PPDA、PBS、CE、M6PT63 和 PET, 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中孵育 6 h, 每孔分别加入 750 μ L TRIZOL, 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.4 Real-Time PCR 按照 TRIZOL 说明书提取细胞总 RNA。提取后用 50 μ L DEPC 水 60 $^{\circ}$ C 溶解 10 min; 加入 RNA 酶抑制剂 (RI, 1 μ L/管), 分光光度计定量后, 参照 TAKARA 反转录试剂盒说明书, 合成 cDNA, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

以 cDNA 为模板, β -actin 基因为内参, 使用 TaqMan Real-Time PCR Master Mix (ABI) 试剂盒检测牛 PBLC 中 IFN- γ 、IL-12p40、IP-10 和 TNF- α 的 mRNA 转录水平。每头牛 PBS 刺激孔样品为空白参照, 每个样品作 3 个重复孔, 用 $\Delta\Delta$ CT 法分析试验数据。

1.2.5 田间筛选结核病阳性牛和结核病阴性牛 通过 TST、IGRA、CET-based ST 和 CE-based IGRA 从结核病流行牛场筛选 10 头结核病阳性牛, 从连续五年没有检测到结核病的牛场中筛选 5 头结核病阴性牛, 分别采集外周血, 放于肝素锂抗凝采血管, 无菌分离 PBLC 分装于 48 孔细胞培养板, 并用 PPDB、PET、CE、MPT63 和 PBS 刺激 6 h, 收获细胞后, 提取总 RNA, Real-Time PCR 检测 IFN- γ 、IL-12p40、IP-10 和 TNF- α 的 mRNA 转录水平, 以初步评价细胞因子转录水平与牛结核病的相关性, 并筛选有潜力用于牛结核病诊断的细胞因子。

1.2.6 人工感染牛验证分子标识

1.2.6.1 *M. bovis* 68002 的复苏及制备 将强毒株 *M. bovis* 68002 冻干粉充分溶解于 2 mL 无菌水中, 取 100 μ L 接种到 7H10 固体培养基斜面, 4 w 后, 挑取单菌落, 转接 7H9 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 连续培养 14 ~ 21 d。收获菌液, 3000 r/min 离心 15 min, 收集菌体沉淀并称重, 用 7H9 培养液重悬至浓度为 400 mg/mL, 混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.6.2 人工攻毒 在连续五年没有检测到结核病的牛场, 用 TST、IGRA、CET-based ST 和 CE-based IGRA 筛选 6 头 1 ~ 2 月龄结核病阴性犍公牛。将 6 头牛随机分成两组, 其中 3 头牛静脉注射 2 mL *M. bovis* 68002 菌液, 另外 3 头牛静脉注射 2 mL PBS 生理盐水作为空白对照。于感染后 20 w 利用

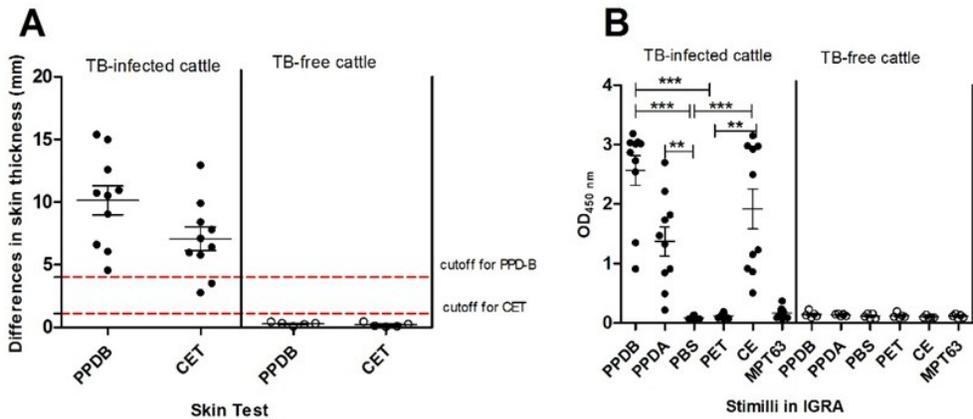
IGRA、CE-based IGRA 检测动物的感染情况。分别于感染前和感染后 30 w, 采集全血, 置于肝素锂抗凝采血管, 无菌分离 PBLC 分装于 48 孔细胞培养板, 并用 PPDB、PET、CE 和 PBS 刺激 6 h, 收获细胞后, 提取总 RNA, Real-Time PCR 检测 IFN- γ 和 IP-10 mRNA 转录水平, 以进一步确认 IFN- γ 和 IP-10 mRNA 转录水平与牛分枝杆菌感染之间的相关性。

1.2.7 牛结核病 IFN- γ 和 IP-10 Real-Time PCR 检测方法在临床上的初步应用 通过 TST、IGRA、CET-based ST 和 CE-based IGRA 从结核病流行牛场筛选 10 头结核病阳性牛, 从连续五年没有检测到结核病的牛场中筛选 6 头结核病阴性牛, 分别采集外周血, 放于肝素锂抗凝采血管, 提取 PBLC 分装于 48 孔细胞培养板, 分别用 PPDB、CE 和 PBS 刺激 6 h, 收获细胞并提取总 RNA, 利用建立的牛结核病 IFN- γ 和 IP-10 Real-Time PCR 检测方法进行检测, 初步评价其对牛结核病检出效果。

1.2.8 统计学分析 将 1.6.1 数据利用 GraphPad Prism 6 软件作 ROC 分析, 获得各细胞因子检测方法的 cutoff 值; 用 ANOVA Kruskal-Wallis 检验分析组间差异; 用 Spearman 检验分析组间相关性; $P < 0.05$ 时, 判定为差异显著。

2 结果与分析

2.1 皮试试验和 IFN- γ 释放试验筛选结核病阳性牛和结核病阴性牛 通过 TST、IGRA、CET-based ST 和 CE-based IGRA 筛选结核病阳性牛 10 头和结核病阴性牛 5 头(图 1)。结果表明以 PPDB、PPDA、PET、PBS、CE 和 MPT63 分别为刺激原刺激全血时, 结核病阴性牛全血经上述抗原刺激后, 其 IFN- γ 水平保持稳定, 而结核病阳性牛全血经 PPDB、PPDA、CE 刺激后, 其 IFN- γ 水平显著高于 PET、PBS 和 MPT63 刺激, 且显著高于结核病阴性牛。因此, MPT63 可能并不适于作为牛结核病 IFN- γ 释放试验的刺激原。



A: 结核菌素皮试试验及基于重组蛋白 CET 的皮试试验; B: IFN- γ 释放试验

图 1 皮试试验及 IFN- γ 释放试验检测结果

Fig 1 Results of skin test and Interferon gamma release assay

2.2 牛结核病细胞因子诊断标识的初步筛选 以 PPDB、PPDA、PBS、PET、CE 和 MPT63 分别对牛 PBLC 进行刺激, 以 β -actin 基因为内参, 进行 Real-Time PCR, 检测 IFN- γ 、IL-12p40、IP-10 和 TNF- α mRNA 转录水平。以每头牛的 PBS 刺激孔样品为参照, 用 $\Delta\Delta$ CT 法分析试验数据, 检测结果如图 2。结果显示 PET 不能刺激阳性牛 PBLC 中

IFN- γ 、IL-12p40、IP-10 和 TNF- α mRNA 转录水平提高, 所以重组蛋白 CE 和 MPT63 中标签蛋白的作用可以忽略不计。MPT63 刺激后, 结核病阳性牛和阴性牛的 IFN- γ 、IL-12p40、IP-10 和 TNF- α mRNA 转录水平并无显著性差异, 这也与 2.1 中的结果吻合。因此, MPT63 不适于作为刺激原。

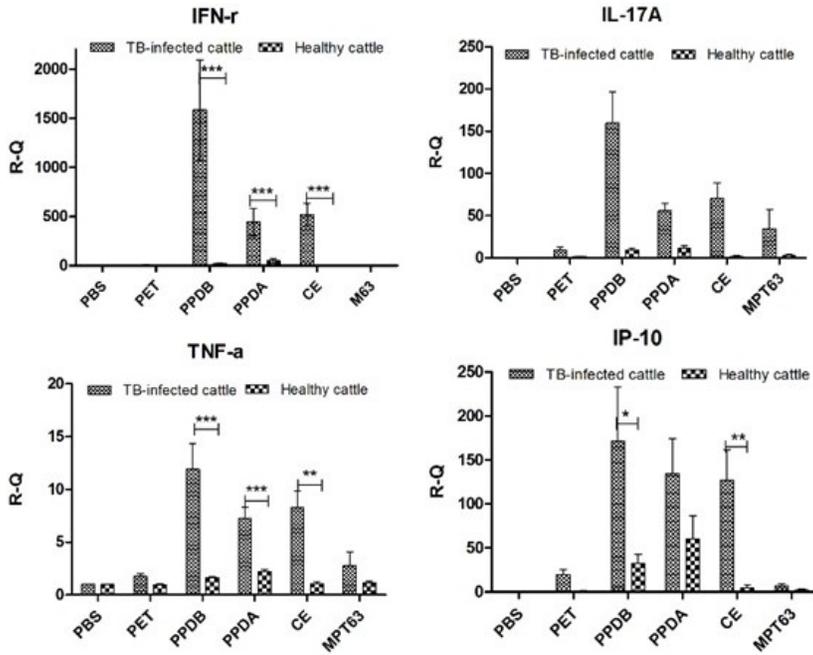


图 2 细胞因子 mRNA 转录水平

Fig 2 The mRNA transcription levels of Cytokines

PPDB、PPDA 和 CE 作为刺激原时,其诱导结核病阳性牛 PBLC 产生的 IFN- γ 、IP-10 和 TNF- α 显著高于结核病阴性牛,由于致病性分枝杆菌和环境分枝杆菌存在交叉抗原,因此以 PPDB 作为刺激原检测细胞因子时,需要同时以 PPDA 作为对照。CE 仅存在于致病性分枝杆菌群中,能够特异性地刺激结核病阳性牛 PBLC 产生 IFN- γ 、IP-10、TNF- α , 因此选择 CE 刺激后牛 PBLC 样品用 Spearman 检验分析细胞因子 mRNA 转录水平之间相关性。结果显示在 CE 刺激 PBLC 后, IFN- γ 与 IL-12p40、IP-10 和 TNF- α 的 mRNA 转录水平之间的相关系数分别为 0.47、0.65 和 0.88,虽然 TNF- α 与 IFN- γ 的 mRNA 转录水平之间相关性最好,但 TNF- α 在结核病阳性牛和阴性牛的转录水平差异较小,作为分子标识可能会发生漏检。因此, TNF- α 并不适合作为牛结核病的分子标识。IL-12p40 与 IFN- γ 、IP-10 和 TNF- α mRNA 转录水平之间的相关系数分别为 0.47、0.15 和 0.45,且结核病阳性牛和阴性牛的 PBLC 经 CE 刺激后, IL-12p40 转录水平无显著性差异,因此 IL-12p40 不适合作为牛结核病的分子

标识。结核病阳性牛 PBLC 经 CE 刺激后, IP-10 的 mRNA 转录水平显著高于结核病阴性牛,且其转录水平与 IFN- γ 呈正相关 (Spearman $r=0.65$), 有作为牛结核病诊断标识的潜力。

为了获得基于 IFN- γ 、IP-10 和 TNF- α mRNA 转录水平的荧光定量 PCR 检测方法的 cutoff 值和其相对的检测灵敏度和特异性,比较 IFN- γ 、TNF- α 和 IP-10 作为牛结核病分子标识的潜力,ROC 方法分析 10 头结核病阳性牛和 5 头阴性健康牛的 CE 刺激后 PBLC 中各细胞因子的 mRNA 转录水平,分析结果如表 2。结果显示以 IFN- γ 、TNF- α 和 IP-10 的 mRNA 转录水平建立的 Real-Time PCR 检测方法的曲线下面积 (AUC) 均大于 0.9,表明该方法能够较为真实地反应牛分枝杆菌的感染情况。由于用于 ROC 分析的样本量少,在筛选 cutoff 值时,只能从 60%、80% 和 100% 的特异性中进行选择,考虑到本次试验中我们选择的阳性牛个体细胞免疫反应均很强,细胞因子的相对表达量也高于文献报道,如果选择特异性 100% 作为指标,获得的 cutoff

值很可能会偏大,会造成漏检,因此,选择特异性为 80%,则 IFN- γ 、TNF- α 和 IP-10 的 cutoff 值分别为

10.45、6.762 和 1.403,其检测灵敏度均可达 90% 以上。

表 1 细胞因子荧光定量 PCR 检测方法的 ROC 分析

Tab 1 ROC analysis of Cytokines-based Real-Time PCR diagnostic methods

Cytokines	AUC	Sensitivity/%	95% CI	Specificity/%	95% CI	cutoff value
IFN- γ	0.94	90	55.50% to 99.75%	60	14.66% to 94.73%	>3.209
		90	55.50% to 99.75%	80	28.36% to 99.49%	>10.45
		90	55.50% to 99.75%	100	47.82% to 100.0%	>98.25
IP-10	0.98	100	69.15% to 100.0%	60	14.66% to 94.73%	>1.839
		100	69.15% to 100.0%	80	28.36% to 99.49%	>6.762
		90	55.50% to 99.75%	100	47.82% to 100.0%	>18.82
TNF- α	0.98	90	55.50% to 99.75%	60	14.66% to 94.73%	>1.313
		90	55.50% to 99.75%	80	28.36% to 99.49%	>1.403
		90	55.50% to 99.75%	100	47.82% to 100.0%	>1.659

2.3 牛结核病细胞因子诊断标识的验证 感染后 20 w,利用 IGRA、CE-based IGRA 检测 6 头试验牛,结果显示 3 头 *M. bovis* 68002 感染牛呈牛结核病阳性,3 头 PBS 注射牛呈牛结核病阴性(数据未显示)。分别于感染前和感染后 30 w 采集全血,无菌分离 PBL 经 CE 和 PBS 刺激后,Real-Time PCR 检测 IFN- γ 和 IP-10 mRNA 转录水平。结果显示 *M. bovis* 68002 感染牛的 PBL 经 CE 刺激后,其 IFN- γ

和 IP-10 mRNA 转录水平显著高于感染 PBS 对照牛,因此 CE 诱导的 IP-10 的转录水平与牛分枝杆菌感染相关,有作为牛结核病分子标识的潜力。

2.4 临床检测结果 利用建立的牛结核病 Real-Time PCR 检测方法,检测临床筛选的 14 头结核病阳性牛,基于 IFN- γ 和 IP-10 mRNA Real-Time PCR 方法检出率分别为 71.4% (10/14) 和 78.57% (11/14)。

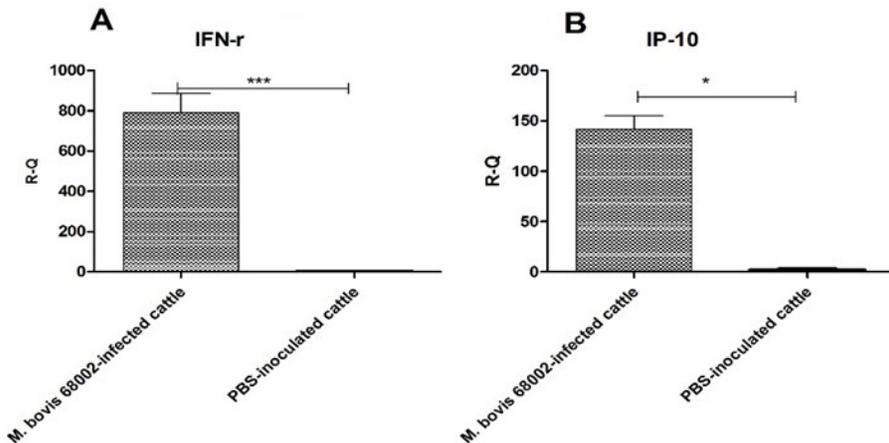


图 3 CE 诱导的 IFN- γ 和 IP10 mRNA 转录水平

Fig 3 The mRNA transcription levels of CE induced IFN- γ and IP10

3 讨论

细胞因子在结核病发病进程中起重要作用,探讨细胞因子的表达水平与牛结核病之间的关系,筛选能够作为结核病诊断用的新型分子标识也是目前结核病研究领域的热点之一。IFN- γ 是重要的免疫调节因子,具有抗病毒和细胞毒的活性,还能够激活巨噬细胞,促进细胞因子的释放,增强巨噬细胞的吞噬作用,是目前用于检测人和动物结核病的细胞因子^[8-9]。其原理是:在体外培养条件下,外周血淋巴细胞(PBLC)再次接触分枝杆菌特异抗原后被活化,表达并释放大量的 IFN- γ ,通过 Real-Time PCR 检测 IFN- γ 的 mRNA 的转录水平,或利用 ELISA 蛋白表达水平,或利用 ELISPOT 技术检测分泌 IFN- γ 的淋巴细胞进行数来判断人或动物是否感染结核病。但是该方法并不能区分结核病的感染期,因此,科研工作者不断寻找新的细胞因子作为检测靶标,以适应不同的检测需求^[10-11]。

研究人员用 CE、PPDB 或 TB10.4 刺激人外周血淋巴细胞,对比细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、IL-12p40、IL-13、IL-17 和 IL-18 的表达水平发现,TNF- α 、IL-12p40 能够用于区分人结核病的开放期和潜伏期感染^[12];IP-10 是 IFN- γ 趋化因子 10 (monocyte-derived chemokine IFN- γ -induced protein 10,亦名为 CXCL10),是最新发现的人结核病分子标识,有作为治疗监测和人结核病进程分子标识的潜力^[11, 13-15]。为了研究细胞因子与牛结核病之间的相关性,筛选新的牛结核病分子标识,本研究首先利用 Real-Time PCR 检测了不同抗原刺激后的田间筛选的结核病阳性牛和阴性牛的 PBLC 的 IL-12 p40、IP-10、IFN- γ 和 TNF- α 的转录水平,发现结核病阳性牛 CE 诱导 IP-10 和 IFN- γ 显著高于结核病阴性牛,且 CE 诱导的 IP-10 和 IFN- γ 转录水平具有良好的相关性;其次发现 *M. bovis* 68002 感染牛的 PBLC 经 CE 刺激后,IP-10 和 IFN- γ 转录水平显著高于 PBS 对照牛,证实 CE 诱导的 IP-10 与牛分枝杆菌感染相关;最后用建立的 Real-Time PCR 方法检测 14 头田间筛选的结核病阳性牛,IP-10 Real-Time PCR 检测出 11 头阳性,

IFN- γ Real-Time PCR 检测出 10 头阳性牛,从而进一步证实 CE 诱导的 IP-10 mRNA 转录水平有作为牛结核病分子标识的潜力。

然而,研究的局限之处在于田间样本量较少,难以获得 IP-10 Real-Time PCR 检测方法准确的 cutoff 值,此外,也未能检测 IP-10 的蛋白质表达水平,未能证实 CE 诱导的血浆中 IP-10 是否可以作为牛结核病分子标识,有待进一步研究。

4 小结

研究发现 IP-10 的 mRNA 转录水平与牛分枝杆菌感染相关,结核病阳性牛的外周血淋巴细胞经牛分枝杆菌特异性抗原 CE 刺激后,其 IP-10 的 mRNA 转录水平与 IFN- γ 呈正相关,且均显著高于结核病阴性牛,建立的 IP-10 Real-Time PCR 方法对 14 头结核病阳性牛的检出率可达 78.57%。因此,CE 诱导的 IP-10 mRNA 转录水平有作为牛结核病分子标识的潜力,但其蛋白表达水平是否可以作为牛结核病分子标识则有待进一步探究。

参考文献:

- [1] Smith N H, Kremer K, Inwald J, *et al.* Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex [J]. *J Theor Biol*, 2006, 239(2): 220-225.
- [2] Doyle L P, Courcier E A, Gordon A W, *et al.* Bovine tuberculosis in Northern Ireland: quantification of the population disease-level effect from cattle leaving herds detected as a source of infection [J]. *Epidemiol Infect*, 2017: 1-11.
- [3] Cousins D V, *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock [J]. *Rev Sci Tech*, 2001. 20(1): 71-85.
- [4] 拉华,王生祥,王湘子,等. 2009~2014 年青海省牛结核病监测与流行趋势分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015(10): 91-93.
La H, Wang Sh X, Wang X Y, *et al.* Monitoring and prevalent trend analysis on bovine tuberculosis in cattle from Qinghai province during 2009 to 2014 [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2015(10): 81-85.
- [5] 韩猛,张亮,王基隆,等. 山东省规模化奶牛场结核病与副结核病流行病学调查研究[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(14): 10-13.
Han M, Zhang L, Wang J L, *et al.* Epidemiological Investigation of Large-scale Dairy Farm on Tuberculosis and Paratubercu-

- losis in Shandong Province[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(14): 10-13.
- [6] 郭爱珍,任宁宁,邓明亮,等. 我国牛羊源人畜共患病的防控现状[J]. 中国动物检疫, 2015, 32(1): 53-63.
Guo A Zh, Ren N N, Deng M L, *et al.* Present Status of the Control of Cattle and Sheep Borne Zoonoses in China[J]. China Animal Health Inspection, 2015, 32(1): 55-63.
- [7] Gallivan M, Shah N, Flood J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003-2011 [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(3): 435-43.
- [8] Lilenbaum W, Schettini J C, Souza G N, *et al.* Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil [J]. Zentralbl Veterinarmed B, 1999, 46(5): 353-358.
- [9] Black G F, Fine P E M, Warndorff D K, *et al.* Relationship between IFN-gamma and skin test responsiveness to Mycobacterium tuberculosis PPD in healthy, non-BCG-vaccinated young adults in Northern Malawi [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2001, 5(7): 664-672.
- [10] Carrere-Kremer S, Rubbo P A, Pisoni A, *et al.* High IFN-gamma release and impaired capacity of multi-cytokine secretion in IGRA supernatants are associated with active tuberculosis [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162137.
- [11] Holm L L, Rose M V, Kimaro G, *et al.* A comparison of interferon-gamma and IP-10 for the diagnosis of tuberculosis [J]. Pediatrics, 2014, 134(6): e1568-1575.
- [12] Sutherland J S, de Jong B C, Jeffries D J, *et al.* Production of TNF-alpha, IL-12(p40) and IL-17 can discriminate between active TB disease and latent infection in a West African cohort [J]. PLoS One, 2010, 5(8): e12365.
- [13] Wang S, Diao N, Lu C, *et al.* Evaluation of the diagnostic potential of IP-10 and IL-2 as biomarkers for the diagnosis of active and latent tuberculosis in a BCG-vaccinated population [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51338.
- [14] Latorre I., Diaz J, Mialdea I, *et al.* IP-10 is an accurate biomarker for the diagnosis of tuberculosis in children [J]. J Infect, 2014, 69(6): 590-599.
- [15] Wergeland I, Pullar N, Assmus J, *et al.* IP-10 differentiates between active and latent tuberculosis irrespective of HIV status and declines during therapy [J]. J Infect, 2015, 70(4): 381-391.

(编辑:陈希)