

王艳萍, 徐倩倩, 孟卫芹, 等. 猪 FoxP3、IL-10 双重实时荧光定量 PCR 方法建立及应用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (1): 66-73.

WANG Y P, XU Q Q, MENG W Q, et al. Establishment of the double RT-qPCR method for pig FoxP3 and IL-10 and its application [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (1): 66-73.

猪 FoxP3、IL-10 双重实时荧光定量 PCR 方法建立及应用

王艳萍¹, 徐倩倩¹, 孟卫芹¹, 王金良^{1,2}, 魏凤¹, 董林^{1,2*}, 刘吉山¹, 谢金文^{1,2}

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600;

2. 山东绿都生物科技有限公司 山东 滨州 256600)

摘要: 旨在建立双重实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法, 对叉头框蛋白 P3 (FoxP3)、白细胞介素 10 (IL-10) 的 RNA 转录进行定量检测。设计并合成 FoxP3、IL-10 的扩增引物和荧光探针, 优化引物浓度、退火温度, 建立 RT-qPCR 方法, 检测猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 感染外周血调节性 T 淋巴细胞 (Treg) 和免疫器官中 FoxP3 和 IL-10 的 mRNA 含量; 根据 Western blot 检测蛋白表达验证方法的可靠性。结果: 建立的 RT-qPCR 方法呈现“S”型扩增曲线, 相关系数 $R^2 \geq 0.99$; 转化生长因子- β (TGF- β)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 6 (IL-6) 和白细胞介素 17 (IL-17) 等基因的核酸模板和阴性对照均无扩增曲线, 最低检测浓度 10 copies/ μ L, 批内、批间变异系数分别为 0.87%、1.84%; PCV2 攻毒组外周血 Treg 细胞中 FoxP3 和 IL-10 的 mRNA 含量均出现明显升高, FoxP3 的 mRNA 含量在攻毒第 14 天到达峰值, IL-10 的 mRNA 含量在攻毒第 10 天到达峰值, PCV2 感染后导致胸腺、淋巴结和脾脏中 FoxP3 和 IL-10 转录水平升高; Western blot 检测表明, FoxP3 蛋白表达量在攻毒第 14 天、第 28 天, IL-10 在攻毒第 10 天和第 14 天显著高于对照组, 与 RT-qPCR 结果一致。综上, 本研究建立的猪 FoxP3、IL-10 双重 RT-qPCR 方法具有特异、敏感、检测稳定可靠的特点, 对于评价猪体的免疫应答水平和机体免疫稳态具有重要意义。

关键词: FoxP3; IL-10; 实时荧光定量 PCR; Treg 活化; 免疫负调控

中图分类号: S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)01-0066-08

Establishment of the double RT-qPCR method for pig FoxP3 and IL-10 and its application

WANG Yanping¹, XU Qianqian¹, MENG Weiqin¹, WANG Jinliang^{1,2},

WEI Feng¹, DONG Lin^{1,2*}, LIU Jishan¹, XIE Jinwen^{1,2}

(1. Binzhou Animal Science and Veterinary Medicine Institute, Binzhou 256600, China;

2. Shandong Lvdu Bio-Sciences & Technology Co., Ltd., Binzhou 256600, China)

Abstract: This study was to establish a dual RT-qPCR method for quantitative detection of FoxP3 and IL-10 transcription. FoxP3 and IL-10 amplification primers and fluorescent probes were designed and synthesized. Primer concentration and annealing temperature were optimized. RT-qPCR method was established, and FoxP3 and IL-10 mRNA contents in peripheral Treg and immune organs infected with PCV2 were detected. Finally, Western blot was used to detect protein expression and verify the reliability of the method. The results were that the established RT qPCR method presented an “S” type amplification curve, with $R^2 \geq 0.99$. None of the TGF- β , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, and IL-17 nucleic acid templates or the negative controls had any amplification curves, with a minimum detection concentration of 10^1 copies/ μ L. The coefficients of variation within and between the batches were 0.87% and 1.84%, respectively. The peripheral blood Treg FoxP3 and IL-10 mRNA levels were both significantly increased in the PCV2 challenge group, with FoxP3 mRNA reaching its peak on 14 days of the experiment and IL-10 mRNA reaching its peak on 10 days. PCV2 infection resulted in an increase in FoxP3 and IL-10 transcription in the thymus, lymph nodes, and spleen. The Western blot analysis showed that FoxP3 was significantly higher than that in the control group on days 14 and 28, and IL-10 was significantly higher on days 10 and 14; which were consistent with the RT qPCR results. In this

收稿日期: 2024-01-02; 修回日期: 2024-10-25

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2023MC212, ZR2022MC173); 滨州市农社领域科技创新政策引导计划项目 (2022KTPY027)

第一作者: 王艳萍, 女, 副研究员

* 通信作者: 董林, 博士, 副研究员, 主要从事动物病毒感染免疫调控机制方面的研究, E-mail: xiaolinzi213@163.com。

study, pig FoxP3 and IL-10 dual RT-qPCR had specificity, sensitivity, and stable and reliable detection points, which was of great significance for evaluating the immune response level and immune homeostasis in pigs.

Keywords: FoxP3; IL-10; RT-qPCR; Treg activation; negative immune regulation

调节性 T 淋巴细胞 (regulatory T cell, Treg) 在免疫应答调控和维持机体免疫稳态中发挥重要作用, 分为天然性 Treg (nTreg) 和诱导性 Treg (iTreg) 细胞^[1-3]。nTreg 细胞限制免疫应答强度, 维持机体对感染的适度性应答, 是临床免疫功能监测的重要指标^[4]。iTreg 细胞由 CD4⁺ T 细胞诱导分化而来, 目前对其诱导因子来源还不清楚, 研究表明叉头框蛋白 P3 (forkhead box protein P3, FoxP3) 高表达是 iTreg 表型的重要条件^[5-6]。Treg 细胞在猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus 2, PCV2) 感染过程发挥重要作用, 提高 FoxP3 表达量, 肺脏内 PCV2 载量升高, 机体特异和固有细胞免疫进一步被抑制^[7]。课题组前期研究也证明, PCV2 感染可以引起 Treg 细胞数量增加, 促进白细胞介素 10 (IL-10)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 和白细胞介素 17A (IL-17A) 等的分泌^[8]。

FoxP3 是叉头状转录因子成员, 特异性表达于 Treg 细胞表面^[9-10], 作为 Treg 细胞主要转录因子, 是其发育的关键开关, 在 Treg 细胞表型和功能发挥上起到重要作用^[11]。FoxP3 高表达通过多种机制赋予 Treg 细胞免疫抑制功能: FoxP3 作为转录调节因子, 其转录与表达对细胞因子白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 4 (IL-4) 和干扰素- γ (IFN- γ) 转录表现抑制效应; 通过抑制细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4) 活化对 Treg 细胞表型建立发挥作用^[12]。同时, FoxP3 持续性表达也是维持 Treg 细胞稳态所必需的, 成熟小鼠或人类 Treg 细胞中 FoxP3 缺失后, Treg 细胞将失去其抑制能力^[13]。IL-10 由 T 细胞、巨噬细胞、树突状细胞和 B 细胞等多种免疫细胞分泌, 在 Treg 细胞调控免疫抑制中发挥重要作用, 介导 Th1 和 Th2 型免疫应答负反馈调控^[14-16]。

FoxP3 和 IL-10 作为 Treg 细胞负调控免疫应答重要因子, 现有研究主要集中在人和小鼠上, 猪的相关因子检测还没有成熟的试剂盒产品, 且仅为单一型的检测^[17-18]。因此, 本研究旨在建立能同时一步法检测猪 FoxP3 和 IL-10 的定量检测试剂盒, 通过对 PCV2 感染导致的 Treg 细胞中 FoxP3 和 IL-10 转录和表达进行定量检测来评价试剂盒实用性, 以期为实现对猪群的免疫状态评价和疫苗推广使用提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

PCV2-LVDU-2016 株 ($10^{6.0}$ TCID₅₀/mL) 由山东省绿都生物科技有限公司提供。

PCV2 抗原、抗体双阴性的 28 日龄断奶巴马香猪仔猪 30 头, 由山东绿都生物科技有限公司实验动物中心提供。

动物组织 RNA 提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒购于北京百泰克生物科技有限公司; Oligo dT、dNTP Mixture、DL2000 DNA Marker、Rnase Inhibitor、2 × One Step RT-PCR Buffer III、*Ex Taq* HS、PrimeScript RT Enzyme Mix II、RNase Free dH₂O、pMD18-T 载体等购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒购自 BioDev-Tech 公司; 大肠杆菌 DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司; 猪外周血淋巴细胞分离液 (200 mL/盒) 为北京 Solarbio 科技有限公司产品; 弗氏不完全佐剂、钥匙孔血蓝蛋白 (KLH) 购自 Sigma 公司; 巯基乙酸培养基购自 Oxodi 公司; CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞分选试剂盒购自 Miltenyi Biotec 公司; RPMI 1640 完全培养液为 Gibco 公司产品; 预先包被 anti-CD3/CD28 抗体的 24 孔板购于 Invitrogen 公司; 山羊抗鼠 IgG-HRP 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 引物、探针设计与合成

根据已知 GenBank 猪 FoxP3 和 IL-10 基因序列, 使用 Premier 5.0 软件设计双重 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测特异性引物组和探针组合 (表 1)。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 探针由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

1.3 标准模板制备

以提取的猪脾脏总 RNA 为模板, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 扩增、回收与纯化 FoxP3 的 PCR 产物, *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切后, 连接 pMD18-T 多克隆位点, 转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性质粒, 提取重组质粒 FoxP3-T。回收纯化 IL-10 的 PCR 产物连接到 FoxP3-T 重组质粒 T 末端, 构建 FoxP3 和 IL-10 双基因串联重组体。测定重组质粒浓度, 按 10^{-1} ~ 10^{-8} 梯度倍比稀释作为标准模板, -20 °C 保存。

1.4 反应体系与程序筛选优化

PCR 反应体系: 总体积 30 μ L, 依次加入 2×One Step RT-PCR Buffer III 15.0 μ L、*Ex Taq* HS 0.5 μ L、

PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.5 μL 、RNase Inhibitor 1.0 μL 和 RNA 模板 3.0 μL ，FoxP3-F/R 和 IL-10-F/R 分别加入 0.25、0.5 和 1.0 μL 3 个梯度，FoxP3-荧光探针和 IL-10-荧光探针分别加入 0.5、0.75、1.0、1.25 和 1.5 μL 5 个梯度，RNase Free

dH_2O 补足 30.0 μL 。引物和 F 荧光探针的摩尔比分别设为 2:3、1:3、2:9 和 1:6，筛选最佳反应体系。PCR 反应程序：42 $^\circ\text{C}$ 8 min；94 $^\circ\text{C}$ 30 s；94 $^\circ\text{C}$ 15 s，54~62 $^\circ\text{C}$ 10 s，40 个循环，进行退火温度优化。

表 1 荧光定量 PCR 引物与探针

引物/探针	序列 (5'→3')	基因编号	基因位置/bp	大小/bp
FoxP3-F	GGCATCATCTGACAAGGGTT	AM999538.1	816~835	165
FoxP3-R	TTGTGAAAGAAATCTGGGAA		980~961	
FoxP3-F	GCTCTAGAGGCATCATCTGACAAGGG	AM999538.1	815~834	181
FoxP3-R	GGGGTACCTTGTGAAAGAAATCTGGGAA		980~961	
IL-10-F	GCGACTTGTGCTGACCG	L20001.1	246~263	121
IL-10-R	CCATCACTCTCTGCCTTC		365~348	
FoxP3-荧光探针	FAM-GTATTGTAGCCACTGGCACC-TAMRA	AM999538.1	842~861	-
IL-10-荧光探针	CY3-CTGCTGGAGGACTTTAAGG-TAMRA	L20001.1	268~286	-

注：1) 下划线为酶切位点，内切酶分别为 *Xba* I 和 *Kpn* I；2) -表示无此项。

1.5 标准曲线绘制

倍比稀释阳性重组质粒得到 $10^1 \sim 10^8$ copies/ μL 的 8 个梯度标准模板，RNase Free dH_2O 作为阴性对照，用优化的双重 RT-qPCR 进行扩增，生成动力学曲线，计算样品扩增 Ct 值和拷贝数之间关系，绘制标准曲线。

1.6 双重 RT-qPCR 方法的性能指标检测

特异性检测：根据 GenBank 数据库中已知 TGF- β 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6 和 IL-17 基因序列，选取高度保守区基因，合成其核苷酸序列，获得对应的标准核酸模板（表 2）。用建立的双重 RT-qPCR 方法对特异性检测核酸模板进行扩增，设置 Treg 总 RNA 为阳性对照，RNase Free dH_2O 为阴性对照，每个样品设置 3 个重复，检测其反应特异性。

表 2 特异性检测细胞因子核酸模板信息

基因	登录号	位置/bp	大小/bp
TGF- β	AF461808.1	112~1284	1173
IFN- γ	DQ902588.1	2~588	587
IL-2	EU249805.1	1~465	465
IL-4	AB174765.1	121~522	402
IL-6	AF518322.1	1~639	639
IL-17	AB102693.1	58~759	702

敏感性检测：以 $10^1 \sim 10^8$ copies/ μL 8 个稀释度的 FoxP3 和 IL-10 双基因重组质粒标准品为模板进行双重 RT-qPCR 扩增，每个稀释度设置 3 次重复。确

定 TaqMan 双重荧光定量 PCR 方法的敏感性，同时设立阴性对照。

重复性检测：以 $10^3 \sim 10^6$ copies/ μL 4 个稀释度的 FoxP3 和 IL-10 双基因重组质粒标准品为模板，分别进行 3 次重复扩增，进行批间、批内重复性检测，计算变异系数，同时设立阴性对照。

1.7 PCV2 感染对外周血 Treg 细胞中 IL-10 和 FoxP3 mRNA 转录水平的影响

1.7.1 PCV2 感染与攻毒

取 PCV2 抗原、抗体双阴性的 28 日龄断奶健康仔猪 30 头，其中 25 头为攻毒组，5 头为空白对照组。攻毒组用 PCV2-LVVDU-2016 株分别于肌肉注射和滴鼻各 1 mL，攻毒第 7 天，采取前腋下和后腿肌肉分点注射弗氏不完全佐剂乳化的 KLH，0.2 mL/头，腹腔注射灭菌的巯基乙酸培养基 0.5 mL/头，攻毒第 10 天和第 20 天再次腹腔注射灭菌的巯基乙酸培养基 0.5 mL/头；空白对照组仅注射相同剂量生理盐水，各组隔离饲养，观察临床症状。分别于攻毒第 0、4、7、14、28 和 42 天前腔静脉采集抗凝血。

1.7.2 Treg 细胞分选与 FoxP3、IL-10 mRNA 含量检测

用外周血淋巴细胞分离液分离、制备单层的淋巴细胞，调整细胞密度至 10^6 个/mL。用 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞分选试剂盒，采用阴性分选和阳性富集方法分选、获得猪 Treg 细胞。流式细胞仪检测 Treg 细胞纯度及其在外周血 T 细胞亚群的百分含量。获得的 Treg 细胞重悬于 RPMI 1640 培养基，以 10^6 个/mL 细胞密度接种预先包被 anti-CD3/CD28 抗体

的24孔板中, 37℃、5% CO₂培养48 h, 同时设置阴性对照。收获 Treg 细胞, 提取总 RNA, 用建立的 FoxP3、IL-10 双重 RT-qPCR 方法进行 mRNA 含量检测。

1.8 PCV2 攻毒对各器官组织中 IL-10 和 FoxP3 mRNA 丰度的影响

攻毒后第10天 PCV2 攻毒组和对照组分别扑杀2头, 分别取脾脏、胸腺、扁桃腺、肝脏、肾脏、肺脏和淋巴结等器官组织, 取对照组各器官组织1.0 g 混合, 作为 RT-qPCR 扩增中的对照, 用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 利用建立的 FoxP3、IL-10 双重 RT-qPCR 方法进行 mRNA 含量检测, 分析 mRNA 丰度差异性。

1.9 PCV2 攻毒对外周血 Treg 细胞中 IL-10 和 FoxP3 表达水平的影响

对攻毒后获取的不同时间段的外周血 Treg 细胞, 提取细胞总蛋白, 用抗 FoxP3、IL-10 单抗为孵育一抗, 山羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗, Western blot 检测 FoxP3、IL-10 蛋白含量, 分析 PCV2 感染对 FoxP3、IL-10 蛋白表达水平的影响, 验证建立的 FoxP3、IL-10 双重 RT-qPCR 方法的可靠性。

1.10 数据统计与分析

采用 SPSS 18.0 软件进行显著性分析, 试验数据用“平均值±标准差”表示。

2 结果

2.1 FoxP3 和 IL-10 基因扩增

图1结果所示, 获得了与预期大小相同基因片段, 大小分别为165 bp 和121 bp。经 DNA 浓度测定, 构建的重组质粒浓度为 537 ng/μL, 换算 DNA 拷贝数为 1.28×10^{11} copies/μL。同时, DNA 测序结果经 BLAST 比较, 与 GenBank 中已登录的猪 FoxP3 和 IL-10 的序列同源性均为100%, 说明成功克隆获得猪的 FoxP3 和 IL-10 双基因扩增片段。

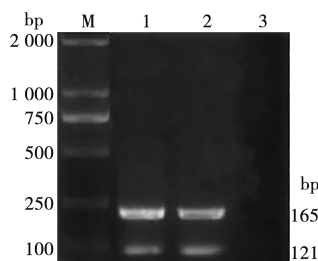
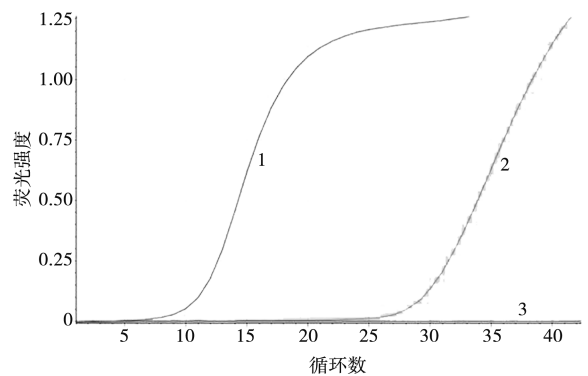


图1 FoxP3、IL-10 双重 RT-qPCR 扩增结果
M. DNA Marker DL2000; 1~2. FoxP3、IL-10 阳性扩增; 3. 阴性对照。

2.2 PCR 反应条件优化

PCR 反应总体积 30 μL, 优化结果为: 2×One Step RT-PCR Buffer III 15.0 μL、Ex Taq HS 0.5 μL、PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.5 μL、5 μmol/L FoxP3-F/R 各 0.5 μL、5 μmol/L IL-10 F/R 各 0.5 μL、15 μmol/L FoxP3-荧光探针 1.0 μL、15 μmol/L IL-10-荧光探针 1.0 μL、RNase Free dH₂O 6.0 μL、RNase Inhibitor 1.0 μL 和 RNA 模板 3.0 μL。反应程序优化为: 42℃ 8 min; 94℃ 30 s; 94℃ 15 s, 62℃ 10 s, 40 个循环。

经优化后 FoxP3 和 IL-10 双重 RT-qPCR 检测方法, 阴性对照无 Ct 值, FoxP3 和 IL-10 阳性对照 Ct 值均小于 30, 扩增曲线呈现典型的“S”型扩增曲线(图2)。



1. FoxP3; 2. IL-10; 3. 阴性对照。

图2 FoxP3、IL-10 双重 RT-qPCR 扩增动力学曲线

2.3 标准曲线绘制

扩增标准曲线显示(图3), 在 $10^1 \sim 10^8$ copies/μL 时, Ct 值与浓度之间有良好的线性关系, 其回归方程分别为, FoxP3: $Y = -3.235X + 40.938$; IL-10: $Y = -3.426X + 40.190$ 。R² 值分别为 0.999 8 和 0.998 8, 均大于 0.99; 扩增效率分别为 97.5% 和 96.8%, 均在 90%~110% 范围内, 说明误差较小, 可信度较高。

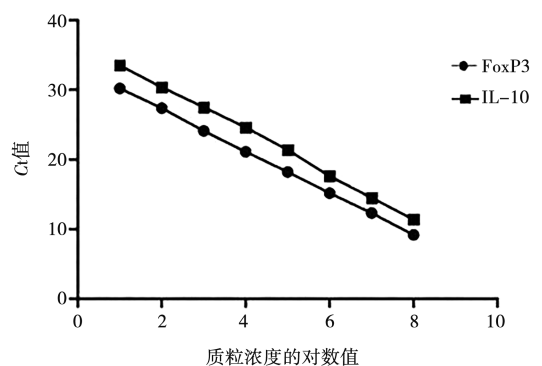


图3 FoxP3、IL-10 双重 RT-qPCR 标准曲线

图1 FoxP3、IL-10 双重 RT-qPCR 扩增结果

2.4 性能指标检测

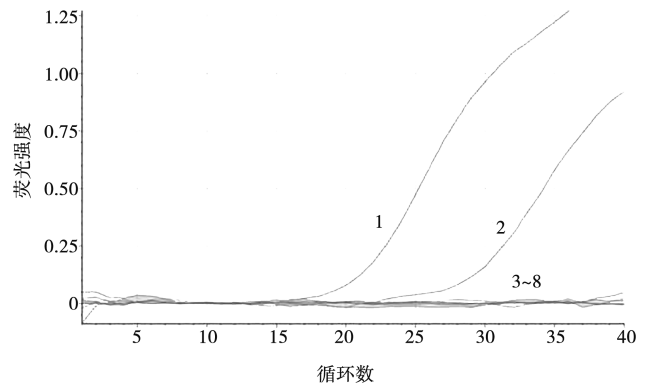
特异性检测结果如图 4 所示, 仅含 FoxP3 和 IL-10 核酸的模板出现特异性扩增曲线, 且 Ct 值均小于 30, 而其他核酸模板和阴性对照均无扩增曲线, 呈阴性, 表明所建立的方法具有较好的特异性。

敏感性结果显示, 在 30 μL 体系中添加 1 μL 体积的 10 倍比稀释的 FoxP3 和 IL-10 基因重组质粒的最低检测模板浓度为 10¹ copies/μL, 表明试剂盒具有良好的敏感性。重复性结果如表 3 所示, 试剂盒批内变异系数为 0.87%, 批间变异系数 1.84%, 均小于 2%, 具有较高重复性。

2.5 Treg 细胞纯度及 T 细胞亚群含量检测

从外周抗凝血中用阴性分选和阳性富集方法分选获得猪 Treg 细胞, 流式细胞仪纯度检测, 其中 Treg 细胞纯度达到 90% 以上, 满足试验对纯度要求 (图 5)。流式细胞仪检测结果见表 4 和图 6。PCV2 攻毒组 Treg 细胞在 T 细胞亚群的百分含量总体高于空白对照组, 其中第 10、14 天时, PCV2 攻毒组极显著

高于空白对照组 ($P < 0.01$)。攻毒第 10 天时, Treg 细胞亚群含量为 7.55%, 显著高于空白组的 3.12%, 第 28 天 Treg 细胞含量有所降低, 第 35 天时 2 组间差异不明显 ($P > 0.05$)。



1. FoxP3 阳性扩增; 2. IL-10 阳性扩增; 3~8. 分别为 TGF-β、IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6 和 IL-17 核酸阴性扩增。

图 4 FoxP3、IL-10 双重 RT-qPCR 特异性检测

表 3 重复性检测结果 (Ct 值)

模板浓度/ (copies · μL ⁻¹)	重复数	批内试验			批间试验		
		均值	标准差	变异系数/%	均值	标准差	变异系数/%
10 ⁶	3	21.22	0.08	0.38	21.92	0.37	1.69
10 ⁵	3	24.63	0.09	0.36	25.14	0.42	1.67
10 ⁴	3	28.17	0.29	1.03	28.43	0.51	1.79
10 ³	3	31.62	0.32	1.01	32.52	0.43	1.32

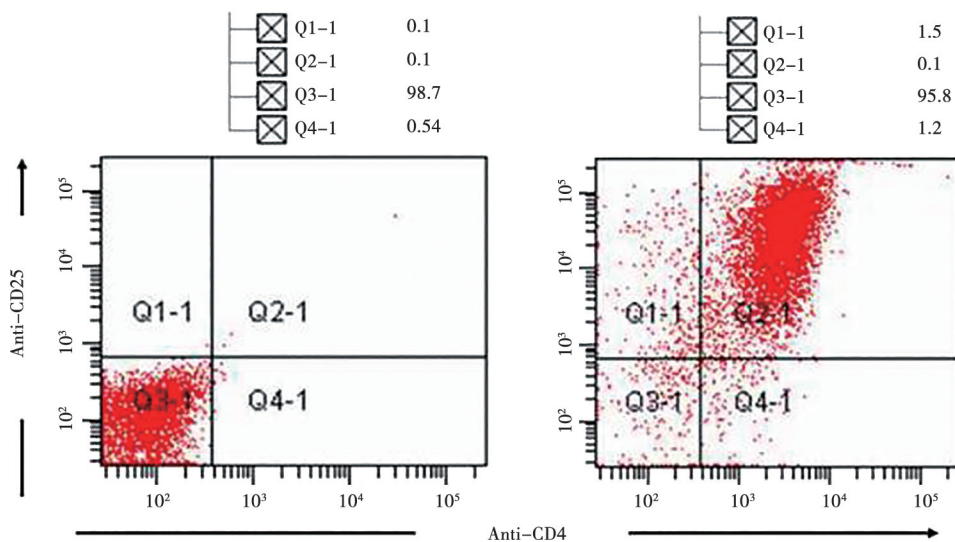


图 5 外周血淋巴细胞中 Treg 分选纯度检测结果

表 4 外周血中 Treg 细胞亚群含量变化

10⁶ 个/mL

组别	第 5 天	第 10 天	第 14 天	第 28 天	第 35 天
空白对照	2.00±0.52	3.12±1.02	5.23±1.31	6.41±1.42	8.78±1.24
PCV2 攻毒	2.85±0.48	7.55±0.89**	9.41±1.52**	7.85±1.36*	9.12±1.74

注: 两组间比较, * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

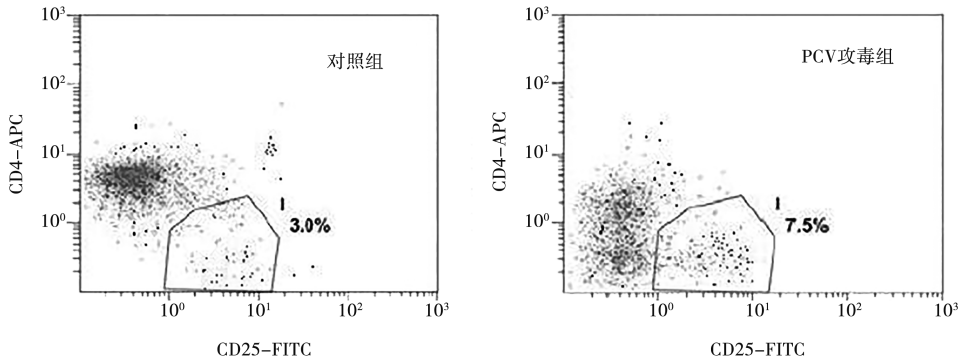


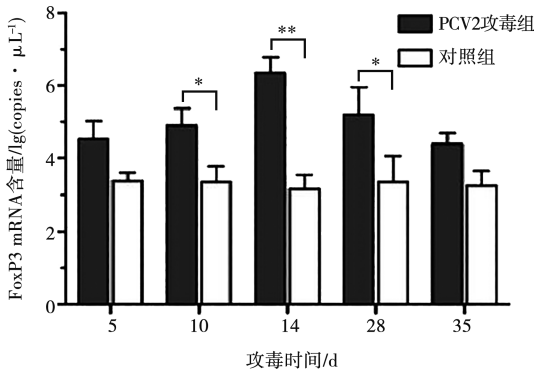
图6 攻毒后第10天外周血T细胞中Treg亚群流式细胞仪检测结果

2.6 外周血Treg细胞中FoxP3和IL-10的mRNA转录水平

由图7和图8可知,PCV2攻毒组外周血Treg细胞中FoxP3和IL-10的mRNA含量均出现明显升高,其中FoxP3的mRNA攻毒后14d到达峰值,IL-10的mRNA含量在攻毒后第10天到达峰值,随后开始降低,攻毒后第35天基本恢复正常水平,对照组在试验期间均无明显变化。结果表明,PCV2感染导致Treg免疫负调控机能激活,使得免疫应答呈现一定程度的抑制性,可持续3周左右。

2.7 不同组织中FoxP3和IL-10的mRNA相对表达量

由图9和图10可知,PCV2感染导致FoxP3和IL-10基因转录水平升高,且转录水平存在一定的组织差异性,FoxP3和IL-10基因转录水平升高主要存在于胸腺、淋巴结和脾脏中,其中胸腺和淋巴结中FoxP3转录水平呈现极显著性升高,胸腺和脾脏中IL-10转录水平呈现极显著性升高($P < 0.01$)。



注:与对照组相比,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$ 。下同。

图7 外周血Treg细胞中FoxP3 mRNA含量检测

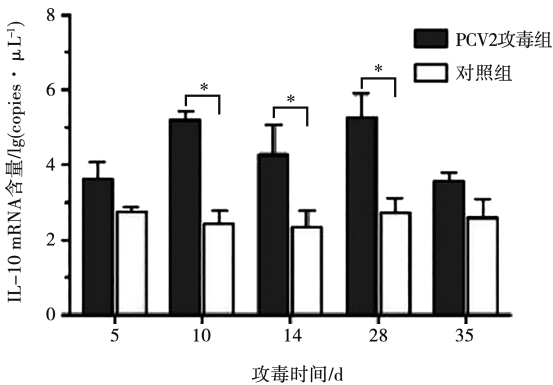


图8 外周血Treg细胞中IL-10 mRNA含量检测

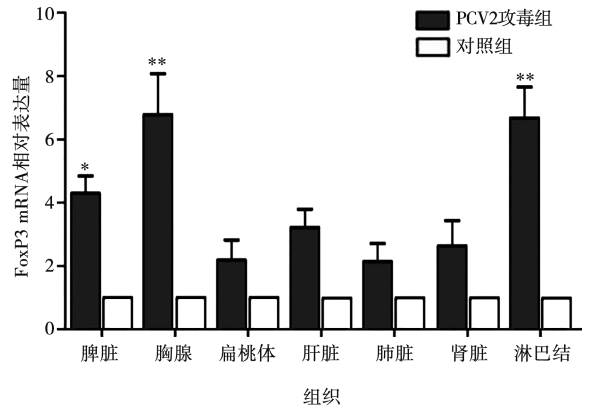


图9 不同组织中FoxP3 mRNA含量检测

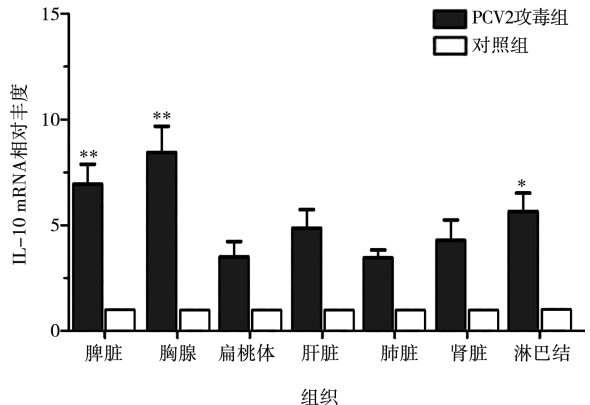
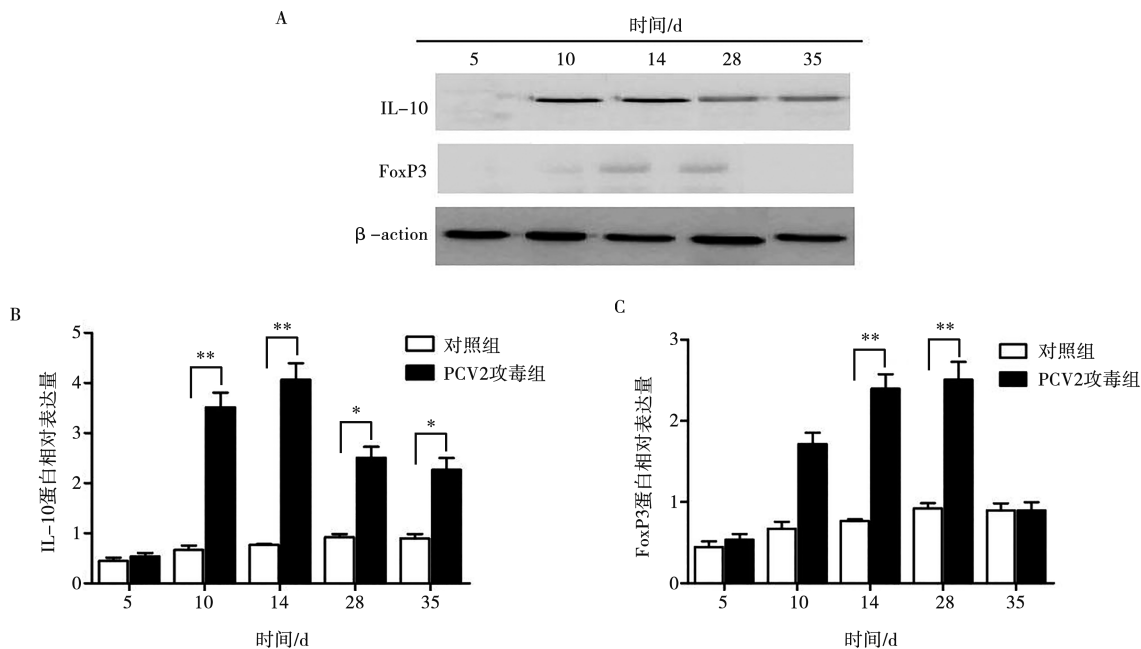


图10 不同组织中IL-10 mRNA含量检测

2.8 外周血 Treg 细胞中 IL-10 和 FoxP3 表达水平

Western blot 检测结果见图 11, PCV2 感染导致外周血 Treg 标志性分子 FoxP3 和主要功能因子 IL-10 表达水平明显增加。其中 IL-10 在第 10、14、28 和 35 天呈现显著性的增加 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), FoxP3 表达在第 10、14 和 28 天呈现明显升高, 在第

14 和 28 天显著高于对照组 ($P < 0.01$)。FoxP3 和 IL-10 在 Western blot 蛋白表达水平检测结果与基因 mRNA 转录水平的变化趋势基本一致, 进一步验证本试验建立的 FoxP3、IL-10 双重定量 RT-qPCR 方法的可靠性。



A. Western blot 检测结果; B. IL-10 蛋白相对表达量; C. FoxP3 蛋白相对表达量。

图 11 外周血 Treg 细胞中 IL-10、FoxP3 表达检测结果

3 讨论

Treg 作为成熟 T 细胞亚群具有调节和维持机体免疫平衡双向功能, 免疫耐受与稳态中发挥关键性作用, 是免疫学领域研究重点^[19]。研究证实 Treg 与多种自身免疫性疾病、器官移植、肿瘤发生有关, 多种病原体的感染可激活 Treg 免疫调节功能激活, 产生免疫负调控, 最后导致机体的免疫抑制发生^[20]。

荧光信号干扰、各引物组和探针组溶解温度 T_m 值差异过大、引物和探针相互干扰等问题是影响双重 RT-qPCR 检测结果准确的关键因素。需要在引物和探针设计、荧光基团进行合理筛选, 对引物浓度、探针浓度以及引物与探针的配比等进行优化, 确定最佳反应体系和扩增程序, 降低干扰, 以获得准确的定量检测结果。本研究筛选的 2 组引物和 2 对探针, 能够特异性地结合同一反应体系中 2 个基因的目的片段, 相互之间不发生交叉反应。优化后的 FoxP3 和 IL-10 双重 RT-qPCR 检测方法, 阴性对照无 Ct 值, 阳性对照 Ct 值均小于 30, 扩增曲线呈现典型的“S”型, 扩增效率达到 95% 以上。建立的用于猪 FoxP3、IL-

10 基因的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法, 通过一步法双重扩增技术, 同步对 FoxP3 和 IL-10 基因转录的 mRNA 进行检测, 操作简便易行, 提高了检测效率。

本研究表明 PCV2 攻毒激活外周血 Treg 功能, 定量检测 mRNA 转录水平, 证实 Treg 表型因子 FoxP3 和效应因子 IL-10 基因转录水平和蛋白表达水平显著升高, 从而调控负免疫应答的发生, 导致免疫抑制。司兴奎等^[21]建立了猪的 IL-10 竞争定量 PCR 方法, 标准竞争曲线, 相关系数 R^2 均在 95% 以上的直线回归方程, 对 PCV2 感染猪外周血淋巴细胞因子定量分析显示, IL-10 mRNA 转录水平在攻毒后第 7 和 14 天均显著高于对照组, 这与本研究的结果相一致。陈耿^[22] 研究显示, PCV2 攻毒仔猪血清中 IL-10 mRNA 含量在攻毒后 35 d 极显著升高, 这与本研究结果有所差别。

同时, 本研究验证建立的 FoxP3、IL-10 双重 TaqMan RT-qPCR 方法具有良好的可靠性。蛋白表达和基因转录是 Treg 调节免疫反应的关键程序, 本研究 Western blot 结果显示, PCV2 感染引起 FoxP3 和

IL-10 表达水平明显增加, 其变化趋势和 mRNA 转录水平变化基本一致。2 种蛋白间表达差异性分析显示, FoxP3 蛋白表达含量明显低于 IL-10, 这与两者在 mRNA 转录水平基本相同有所不同, 可能与 FoxP3 主要发挥 Treg 表型功能, 更多的是与各类效应因子结合, 传递信号和激活各类因子的转录与表达^[12], 而 IL-10 是 Treg 发挥功能的主要效应因子, 直接关联到免疫调节的活性^[17]。同时, 研究发现, FoxP3 mRNA 转录后存在多种修饰^[15], 这也是导致其蛋白表达差异性的因素之一。

综上, 本研究建立的双重 RT-qPCR 方法特异性、敏感性和稳定性均良好, 实现了对猪 Treg 标记分子 FoxP3 和分泌性效应因子 IL-10 的快速准确定量, 对于判定猪群的免疫应答状态和指导临床疫苗免疫具有重要意义。

参考文献:

- [1] DARWICH L, SEGALÉS J, DOMINGO M, et al. Changes in CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺ CD8⁺, and immunoglobulin M⁻ positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues [J]. *Clinl Diagn Lab Immunol*, 2002, 9 (2): 236-242.
- [2] LI S, GOWANS E J, CHOUGNET C, et al. Natural regulatory T cells and persistent viral infection [J]. *J Virol*, 2008, 82 (1): 21-30.
- [3] SAKAGUCHI S, YAMAGUCHI T, NOMURA T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance [J]. *Cell*, 2008, 133 (5): 775-787.
- [4] 史利军, 任林柱, 李刚. 猪圆环病毒 2 型免疫抑制机理研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2009, 30 (3): 74-76.
- [5] 刘远. PCV2 感染对小鼠肠道黏膜免疫的影响 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- [6] 刘圆圆, 郭薇, 冯晓明. 调节性 T 细胞 FoxP3 表达及稳定性的控制机制 [J]. *中国科学*, 2017, 47 (12): 1415-1420.
- [7] CAMPBELL D J. Control of regulatory T cell migration, function, and homeostasis [J]. *J Immunol*, 2015, 195 (6): 2507-2513.
- [9] 董林, 王艳萍, 唐娜, 等. PCV2 感染对猪淋巴细胞 NF- κ B 信号通路及炎性细胞因子表达的动态影响 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42 (6): 1115-1121.
- [9] LI X, ZHENG Y. Regulatory T cell identity: formation and maintenance [J]. *Trends Immunol*, 2015, 36: 344-353.
- [10] MAHMUD S A, MANLOVE L S, FARRAR M A, et al. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function [J]. *JAKSTAT*, 2013, 2 (1): e23154.
- [11] FENG Y, ARVEY A, CHINEN T, et al. Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the FoxP3 locus [J]. *Cell*, 2014, 158 (4): 749-763.
- [12] 杨爽, 汤玉瑜. FOXP3 在调节免疫应答中的作用 [J]. *免疫学杂志*, 2016, 32 (3): 262-267.
- [13] 王舒莉, 董巧凤, 李芳, 等. Treg、FoxP3 和 TGF- β 在慢性髓系白血病中的表达及意义 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2023, 31 (3): 666-670.
- [14] ONO M. Control of regulatory T-cell differentiation and function by T-cell receptor signalling and FoxP3 transcription factor complexes [J]. *Immunology*, 2020, 160 (1): 24-37.
- [15] DONG Y, YANG C, PAN F, et al. Post-translational regulations of FoxP3 in Treg cells and their therapeutic applications [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 626172.
- [16] 王晓波. CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞在 PCV2 持续性感染中的作用 [D]. 保定: 河北农业大学, 2015.
- [17] 李东杰, 薛永平, 刘丽媛, 等. IL-10 表达对小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞亚群相关细胞因子的影响 [J]. *宁夏医学杂志*, 2023, 45 (10): 878-882.
- [18] 齐佳欣, 钟秋, 刘芮伶, 等. 猪源 CXCL17 的原核表达及其对猪巨噬细胞的趋化作用 [J]. *南京农业大学学报*, 2024, 47 (5): 932-940.
- [19] PAPAUTOPOULOU S, POLLOCK L, WILLIAMS J M, et al. Interleukin-10 deficiency impacts on TNF-induced NF κ B regulated responses *in vivo* [J]. *Biology (Basel)*, 11 (10): 1377.
- [20] RASQUINHA M T, SUR M, LASRADO N, et al. IL-10 as a Th2 cytokine: differences between mice and humans [J]. *Journal of Immunology*, 2021, 207 (9): 2205-2215.
- [21] 司兴奎, 郭鑫, 杨汉春. 猪圆环病毒 2 型感染对猪外周血单核细胞亚群含量的影响 [J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30 (12): 973-977.
- [22] 陈耿. PCV2 感染对仔猪免疫机能的影响及细胞因子的变化 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.