

TGF- β 1 诱导人胃腺癌 SGC-7901 细胞建立 EMT 模型

梁 巍 孙文广 姜佳佳 李 洋 闫雅更 董凤丽

摘 要 **目的** 拟利用 TGF- β 1 诱导人胃癌 SGC-7901 细胞发生上皮间质转化(EMT),建立 EMT 模型。**方法** 不同浓度 TGF- β 1 作用 SGC-7901 细胞 24h,观察其形态变化,并采用 CCK8、迁移试验、细胞侵袭试验和蛋白印迹等技术,检测 TGF- β 1 对 SGC-7901 细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响。**结果** 经 10ng/ml TGF- β 1 诱导 24h 后,多数细胞变为梭型细胞边界基本消失,细胞间间隙明显增大。采用 CCK-8 试验检测不同浓度(0、5、10、20ng/ml)的 TGF- β 1 对 SGC-7901 细胞作用 24h 后 OD 值,结果显示各作用浓度对 SGC-7901 的生长抑制率未发现有增加或减少趋势。体外划痕试验检测细胞迁移能力实验中,各组间距为 94.67 ± 3.06 、 87.00 ± 3.61 、 68.67 ± 7.77 和 91.00 ± 3.00 (单位:像素),10ng/ml 剂量组有大量细胞迁移至划痕区,划痕间距明显变小($P < 0.05$)。Transwell 小室侵袭实验结果:0、5、10、20ng/ml 组,侵袭的细胞数分别为 152.00 ± 5.29 、 169.00 ± 6.00 、 299.33 ± 10.50 和 176.00 ± 11.27 ,且 10ng/ml 剂量组细胞数明显增多($P < 0.05$)。蛋白免疫印迹定量分析显示:不同浓度(0、5、10、20ng/ml)的 TGF- β 1 作用 SGC-7901 细胞 24h, E-cadherin 蛋白灰度值测量结果:0、5、10、20ng/ml 组,分别为 0.95 ± 0.02 、 0.91 ± 0.04 、 0.62 ± 0.05 和 0.75 ± 0.32 ,10ng/ml 剂量组灰度值明显减少($P < 0.05$); Vimentin 蛋白灰度值测量结果:0、5、10、20ng/ml 组,分别为 1.18 ± 0.03 、 1.33 ± 0.02 、 1.57 ± 0.05 和 1.19 ± 0.07 ,10ng/ml 剂量组灰度值明显增加($P < 0.05$)。**结论** 10ng/ml TGF- β 1 诱导人胃腺癌 SGC-7901 细胞 24h 后,细胞明显发生 EMT 过程,本研究证明在人胃腺癌 SGC-7901 细胞系,通过 10ng/ml TGF- β 1 的诱导 24h 可以成功建立 EMT 模型。

关键词 细胞上皮间质转化 TGF- β 1 人胃腺癌细胞 诱导

[中图分类号] R735 [文献标识码] A

By TGF- β 1 Induced Human Gastric Cancer SGC-7901 Cells Establish EMT Model. Liang Wei, Sun Wenguang, Jiang Jiajia, et al. First Affiliated Hospital of Harbin Medical University Clinical Nutrition, Heilongjiang 150001, China

Abstract Objective By using TGF- β 1 induced human gastric cancer SGC-7901 cells which occurs epithelial-mesenchymal transformation and establish the model of the epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** Using the different concentrations of TGF- β 1 effect on SGC-7901 cells for 24h, observing the morphological changes, using CCK8, migration assay, cell invasion assay and Western blot techniques to test TGF- β 1 on SGC-7901 cell's capacity of proliferation, migration, and invasion. **Results** After induction by 10ng/mL TGF- β 1 in 24h, the majority of cells turned to fusiform cell, cell borders disappeared, the gap between cells had significantly increasing. After impact of different concentrations of TGF- β 1 on SGC-7901 cells in 24h, SGC-7901 cells OD values checked by CCK-8 assay showed that the inhibition of SGC-7901 growth rate didn't increase or decrease. In the experiments of checking cell migration capacity by the vitro scratch test, the group spacing were: 94.67 ± 3.06 , 87.00 ± 3.61 , 68.67 ± 7.77 and 91.00 ± 3.00 (units pixels), a large number of cell of 10ng/ml group migrated to the scratch area, scratch spacing was significantly smaller ($P < 0.05$). Transwell chamber invasion assay results: 0, 5, 10, 20ng/ml group, the corresponding number of cell invasion were 152.00 ± 5.29 , 169.00 ± 6.00 , 299.33 ± 10.50 and 176.00 ± 11.27 , and the 10ng/ml group's number of cells increased significantly ($P < 0.05$). Quantitative of Western blot analysis showed that: after different concentrations (0, 5, 10, 20ng/ml) of TGF- β 1 induce SGC-7901 cells 24h, E-cadherin protein gray value measurements: 0, 5, 10, 20ng/ml groups were 0.95 ± 0.02 , 0.91 ± 0.04 , 0.62 ± 0.05 and 0.75 ± 0.32 , 10ng/ml group's gray values significantly decreased ($P < 0.05$); Vimentin protein gray value measurements showed that 0, 5, 10, 20ng/ml group were 1.18 ± 0.03 , 1.33 ± 0.02 , 1.57 ± 0.05 and 1.19 ± 0.07 , 10ng/ml group's gray values increased sig-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81273061)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院临床营养科(梁巍、孙文广、姜佳佳、闫雅更、董凤丽);上海市第六人民医院东院临床营养科(孙文广);哈尔滨医科大学附属第一医院血液中心实验室(李洋)

通讯作者:孙文广,教授,主任医师,硕士生导师,电子信箱:657808972@qq.com

nificantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Cells SGC-7901 induced by 10ng/ml TGF- $\beta 1$ in 24h, occurs EMT significantly. This study demonstrates that: using human gastric carcinoma cell line SGC-7901 induced by 10ng/ml TGF- $\beta 1$ in 24h, EMT model can be successfully established.

Key words EMT; TGF- $\beta 1$; Human gastric cancer; Induction

细胞上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是指在某些特殊的生理或病理条件下,具有极性的上皮细胞顶端-基底极性消失,细胞间紧密连接缺失,转变成具有迁移和运动能力、可在细胞基质间移动的间质细胞的过程^[1,2]。这一过程促进肿瘤细胞侵袭和转移,并维持其间质特性和转移特性^[3,4]。研究发现^[5], TGF- $\beta 1$ 可以调节 EMT 过程,且是最重要的诱导因子之一,在多种肿瘤中高表达,诱导肿瘤细胞的上皮间质转化^[6]。有研究认为 Smad 经典通路和多条非 Smad 通路共同参与了 TGF- $\beta 1$ 诱导的 EMT 过程^[7]。EMT 能促进组织修复,同时也与慢性炎症、癌症转移、发展,器官纤维化等多种病理状态密切相关^[8]。本研究将使用 TGF- $\beta 1$ 研究诱导人胃癌 SGC-7901 细胞,观察其形态、迁移和侵袭能力变化,判断是否发生 EMT,为以后进一步研究 EMT 过程中,如何抑制癌症转移提供理论依据。

材料与方法

1. 主要试剂: TGF- $\beta 1$ 购自 Sigma 公司。人胃癌细胞 SGC-7901 北京市肿瘤研究所,该细胞在含体积分数为 1% 的青霉素、1% 谷氨酰胺和 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液中,于 37℃ 恒温培养,用 0.02% EDTA 消化、传代。RPMI 1640 培养基和 PBS 缓冲液购自 Hyclone 公司、胎牛血清购自 PAA 公司。Transwell 小室(3428 型),Corning 公司; Matrigel 基质胶(5g/L),BD 公司。细胞增殖与活性检测(Cell Counting Kit8/CCK-8 试剂盒/WST8)购自碧云天公司。BCA 提取蛋白试剂盒购自碧云天公司。鼠抗 β -actin 抗体购自碧云天公司。兔抗 Vimentin 单克隆抗体和 E-cadherin 多克隆抗体购自 Sigma 公司。抗鼠二抗购自北京中山金桥公司。抗兔二抗购自 Sigma 公司。其他化学试剂均为国产分析纯。

2. 实验方法:(1)镜下观察细胞形态变化:将 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,培养 24h 后,换成 0、5、10、20ng/ml 的 TGF- β 的 2% 胎牛血清培养液,继续培养 24h,40 倍光镜下观察并拍照。(2)细胞增殖抑制曲线:将 SGC-7901 细胞接种于 96 孔培养板中,每孔 1×10^4 个细胞,培养 24h 后,换成含 0、5、10、20ng/ml 的 TGF- $\beta 1$ 的 2% 胎牛血清培养液,继续培养 24h。加入 10 μ l 的 CCK-8 试剂,孵育 2h 后于酶标仪波长 570nm 处测定吸光度(A)值,同时设以空白培养基为对照。计算细胞增殖抑制率(inhibitory frequencies, IF)并绘制细胞增殖抑制曲线。IF(%) = (对照组 A 值 - 试验组 A 值)/(对照组 A 值 - 空白组 A 值) $\times 100\%$ 。(3)

体外划痕法检测细胞迁移:取对数生长期细胞用 0.02% EDTA 消化后计数,以 2×10^6 /ml,把胃癌细胞分别接种至 6 孔培养板中,待细胞生长达到 70% ~ 80% 密度后,分别给予 0、5、10 和 20ng/ml TGF- $\beta 1$ 处理 24h 后,除去培养液,用 10 μ l Eppendorf TiP 在细胞板上划痕,造成损伤模型,PBS 冲洗掉刮起的细胞,再使用无血清培养液培养 24h 后,在倒置显微镜下照相。(4)体外细胞侵袭实验:在 24 孔培养板内加入 20% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液,每孔 900 μ l。将加入 0、5、10、20ng/ml 的 TGF- $\beta 1$ 处理 24h 的 SGC-7901 细胞制成 2×10^5 /ml 细胞悬液,加到 Transwell 小室中,每小室 100 μ l,使用不含胎牛血清的培养液。将小室浸于 24 孔板的 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中。37℃、5% CO₂ 培养箱内孵育 24h。将 Transwell 小室取出,用甲醇固定 30min,用棉签吸去上层甲醇,并轻轻擦掉膜上层的细胞。姬姆萨染色,显微镜下每张滤膜随机取 10 个视野,计数穿膜细胞数,取平均数表示每种肿瘤细胞的侵袭能力。(5)免疫印迹定量分析:在 50ml 有孔培养瓶中接种 2×10^5 /ml 细胞悬液 5ml,37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养,24h 后换液。待细胞生长到一定数量后更换就培养基为 0、5、10、20ng/ml 的 TGF- $\beta 1$ 的 2% 胎牛血清培养液,继续培养 24h。使用 RIPA 裂解液(80 微升/管)裂解细胞,提取总蛋白,使用 BCA 试剂对蛋白浓度测量,进行 SDS-PAGE 电泳。电转蛋白到 PVDF 膜上,1% BSA 置摇床上室温封闭 1h,分别加入抗人的 Vimentin 单克隆抗体(1:1000),抗人的 E-cadherin 多克隆抗体(1:1000),4℃ 孵育过夜。TBST 溶液洗涤 10 分钟/次,3 次,酶标二抗反应(1:7500)37℃ 恒温摇床轻摇 1h, TBST 溶液洗涤,显色。以 β -actin 作为内对照校正并作相对定量分析。数值以二者吸光度积分的比值表示。

3. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计方法的选择单因素方差分析,两两比较选择 SNK 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞形态的改变:倒置显微镜下可以观察到,在 TGF- β 10ng/ml 剂量组,即空白对照组,细胞呈不规则多边形,边界清晰,细胞与细胞间连接紧密。在加入 TGF- $\beta 1$ 的 5、10、20ng/ml 剂量组均可以观察到细胞的形态发生不同程度的改变:细胞拉长变成梭型,细胞边界模糊,细胞间间隙变大。尤其是 10ng/ml 剂量,多数细胞变为梭型细胞边界基本消失,细胞间间隙明显增大(图 1)。

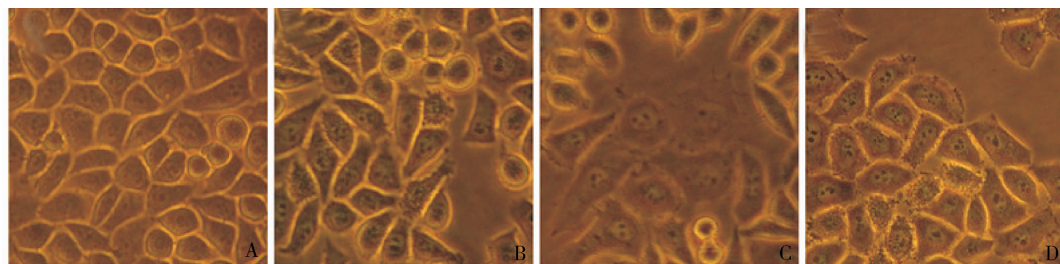


图 1 不同浓度的 TGF-β1 作用于 SGC-7901 细胞形态 (×40)

2. 细胞增殖抑制曲线: 采用 CCK-8 试验检测不同浓度的 TGF-β1 对 SGC-7901 细胞作用 24h 后 A 值, 结果显示随 TGF-β1 剂量浓度的增加, 对 SGC-7901 的抑制率未发现有增加或减少趋势。对 A 值进行统计分析和描述, 尚不能认为差异有统计学意义 ($F = 1.61, P = 2.62$)。在 SGC-7901 细胞增殖影响实验中, 0、5、10、20ng/ml 组, 测量的 A 值, 分别为 0.99 ± 0.05 、 1.05 ± 0.07 、 0.91 ± 0.10 和 1.06 ± 0.12 。

3. 体外划痕试验检测细胞迁移能力: 不同浓度的 TGF-β1 作用于 SGC-7901 细胞 24h 后, 可见随着

药物浓度改变迁移至划痕区的间距大小均不同程度减小, 10ng/ml 剂量组有大量细胞迁移至划痕区, 划痕间距明显变小。对划痕间距进行测量并统计分析和描述, 说明各组间的划痕间距间有差异且差异有统计学意义 ($F = 17.445, P = 0.001$)。在 TGF-β1 诱导 SGC-7901 细胞体外划痕实验中, 0、5、10、20ng/ml 组, 测量的划痕间距值, 分别为 94.67 ± 3.06 、 87.00 ± 3.61 、 68.67 ± 7.77 和 91.00 ± 3.00 (单位: 像素)。10ng/ml 剂量组与 0ng/ml 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

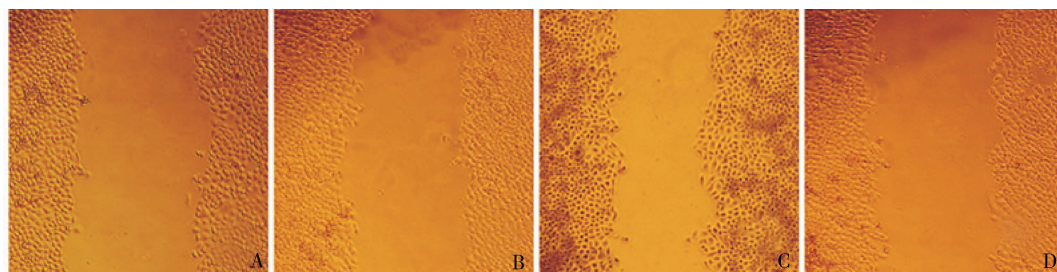


图 2 不同浓度的 TGF-β1 作用于 SGC-7901 细胞迁移能力的影响 (×10)

A ~ D 分别为 TGF-β1 的浓度为 0、5、10 和 20ng/ml

4. 细胞侵袭能力的影响: Transwell 小室侵袭实验结果显示, 不同浓度的 TGF-β1 作用于 SGC-7901 细胞 24h 后, 肿瘤细胞侵袭穿透 Matrigel 胶和 Transwell 小室微孔膜的能力明显变化, 穿膜细胞数目随着药物浓度改变明显不同, 差异有统计学意义 ($F = 181.921, P = 0.000$)。在 SGC-7901 细胞侵袭实验中, 0、5、10、20ng/ml 组, 侵袭的细胞数分别为 152.00 ± 5.29 、 169.00 ± 6.00 、 299.33 ± 10.50 和 176.00 ± 11.27 。10ng/ml 剂量组与 0ng/ml 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

5. 免疫印迹定量分析 (图 4): 蛋白免疫印迹定量分析显示: 不同浓度的 TGF-β1 作用于 SGC-7901 细胞 24h 后, 对 SGC-7901 细胞中 E-cadherin 蛋白表达的影响: 不同浓度 (0、5、10、20ng/ml) 的 TGF-β1 作用 SGC-7901 细胞 24h 后, E-cadherin 蛋白表

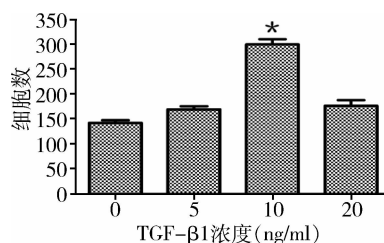


图 3 不同浓度的 TGF-β1 作用于 SGC-7901

细胞侵袭能力的影响

与 0ng/ml 组比较, * $P < 0.05$

达随剂量的递增灰度值发生变化, 差异有统计学意义 ($F = 39.77, P = 0.002$)。0、5、10、20ng/ml 组, 分别为 0.95 ± 0.02 、 0.91 ± 0.04 、 0.62 ± 0.05 和 0.75 ± 0.32 。其中 10 和 20ng/ml 两个剂量组与 0ng/ml 剂量组比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

对 SGC - 7901 细胞中 Vimentin 蛋白表达的影响:不同浓度(0、5、10、20ng/ml)的 TGF - β 1 作用 SGC - 7901 细胞 24h, Vimentin 蛋白表达随剂量的递增灰度值发生变化,差异有统计学意义($F = 26.01$, $P = 0.004$)。0、5、10、20ng/ml 组,分别为 1.18 ± 0.03 、 1.33 ± 0.02 、 1.57 ± 0.05 和 1.19 ± 0.07 。其中 10ng/ml 剂量组与 0ng/ml 剂量组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

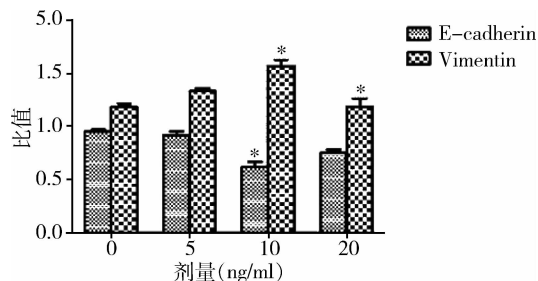


图4 不同浓度的 TGF - β 1 作用于 SGC - 7901 细胞 24h 后,对 SGC - 7901 细胞中 E - cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响
与 0ng/ml 组比较, * $P < 0.05$

讨 论

肿瘤细胞的 EMT 使肿瘤细胞获得间质细胞特性,包括细胞极性消失、形态改变、间质标志物表达以及迁移和侵袭能力的获得等,并增加肿瘤的侵袭和转移^[9]。本研究用不同浓度的 TGF - β 1 诱导人胃腺癌 SGC - 7901, 24h 后在电镜下观察细胞形态的变化,观察发现随着剂量的改变,细胞形态发生变化,尤其是 10ng/ml 剂量组,诱导为细胞间间隙增大,细胞壁不同程度缺失,细胞呈梭型改变,说明 TGF - β 1 可以诱导 SGC - 7901 细胞的形态改变,使其细胞与细胞连接变松散,细胞间黏附力减弱。采用 CCK - 8 实验检测结果显示,随 TGF - β 1 浓度的增加,SGC - 7901 细胞增殖无明显抑制,说明 TGF - β 1 对 SGC - 7901 细胞增殖没有抑制作用。划痕实验结果显示,不同浓度的 TGF - β 1 诱导人胃腺癌 SGC - 7901 细胞, 24h 后在 10ng/ml 剂量组间距离明显减小,说明 SGC - 7901 细胞的迁移能力明显增加。侵袭实验结果显示,10ng/ml 剂量组 TGF - β 1 诱导人胃腺癌 SGC - 7901 细胞, 24h 后肿瘤细胞侵袭穿透 Matrigel 胶和 Transwell 小室微孔膜的能力明显增加,穿膜细胞数目明显比对照组增多,说明其侵袭能力明显增加。

研究表明,在胚胎或肿瘤上皮细胞中, TGF - β 1

可以诱导 EMT 发生,这一过程在肿瘤的发展过程中能够促进肿瘤的侵袭和转移^[10,11]。研究发现,在 EMT 过程中,上皮标志物 E - cadherin、ZO - 1 (zonula occluden - 1) 等蛋白表达下调,间质标志物 Vimentin、N - cadherin 等蛋白表达上调^[12,13]。本研究用不同浓度,0、5、10、20ng/ml TGF - β 1 对 SGC - 7901 诱导 24h 后,结果显示在 10ng/ml 剂量组,上皮标志物 E - cadherin 蛋白表达明显下降,间质标志物 Vimentin 蛋白表达明显增加。Zeiserg 等^[19]研究确定,在体外实验,细胞发生上皮间质转化的判定标准中主要标准有:上皮标记的丧失;细胞形态呈梭型,同时伴有细胞极性的丧失;迁移能力增加,当诱导因子去除后上述表型能够稳定保持^[14,15]。结合以上判定标准,可以得出,在 TGF - β 1 诱导人胃腺癌 SGC - 7901 细胞后,细胞明显发生 EMT 过程,所以,在人胃腺癌 SGC - 7901 细胞系,通过 10ng/ml 剂量组 TGF - β 1 的诱导 24h 成功建立 EMT 模型。

参考文献

- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, *et al.* Epithelial - mesenchymal transitions in development and disease [J]. Cell, 2009, 139 (5): 871 - 890
- Yang J, Weinberg RA. Epithelial - mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis [J]. Dev Cell, 2008, 14 (6): 818 - 829
- Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial - mesenchymal transitions: a cancer researcher's conceptual friend and foe [J]. Am J Pathol, 2009, 174 (5): 1588 - 1593
- 倪建波, 郭传勇, 王兴鹏. 非可控性炎症和肿瘤细胞上皮间质转化关系的研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18 (17): 1417 - 1420
- Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial - mesenchymal transition during tumor progression [J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17 (5): 548 - 558
- Bates RC. Colorectal cancer progression: Integrin alphavbeta and the epithelial - mesenchymal transition (EMT) [J]. Cell Cycle, 2005, 4 (10): 1350 - 1352
- Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF - beta - induced epithelial to mesenchymal transition [J]. Cell Res, 2009, 19 (2): 156 - 172
- 葛燕, 孙林, 刘伏友. 腹膜间皮细胞 EMT 在腹膜纤维化中的研究进展及意义 [J]. 医学与哲学, 2010, 31 (9): 46 - 54
- Acloque H, Adams MS, Fishwick K. Epithelial - mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease [J]. J Clin Invest, 2009, 119 (6): 1438 - 1449
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, *et al.* Epithelial - mesenchymal transitions in development and disease [J]. Cell, 2009, 139 (5): 871 - 890
- Yamamoto H, Mukaisho K, Sugihara H, *et al.* Down - regulation of FXYD3 is induced by transforming growth factor - β signaling via

- ZEB1/ΔEF1 in human mammary epithelial cells [J]. *Biol Pharm-Bull*, 2011, 34(3):324-329
- 12 Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial - mesenchymal transitions [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6):1429-1437
- 13 Yap WN, Chang PN, Han HY, *et al*. Gamma - tocotrienol suppresses prostate cancer cell proliferation and invasion through multiple - signalling pathways [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(11):1832-1841
- 14 Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial - mesenchymal transitions [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6):1429-1437
- 15 Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, *et al*. The epithelial - mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease [J]. *J Cell Biol*, 2006, 172(7):973-981
- (收稿日期:2013-11-07)
- (修回日期:2013-11-26)

肾综合征出血热汉坦病毒分型及序列特征的研究

盛 欣 陈淑红 兰英华 陈国林 郭 伟 王开利 李用国

摘 要 **目的** 分析黑龙江省肾综合征出血热(HFRS)患者携带汉坦病毒的基因型别及序列特征。**方法** 采集临床诊断为肾综合征出血热病人的全血 60 例,其中通过金标法检测出血热特异性抗体阳性 40 例、阴性 20 例,血凝块提取汉坦病毒 RNA,应用 RT - Nest - PCR 及核苷酸序列测定分型技术对黑龙江地区的汉坦病毒进行分型研究,设计汉坦病毒 M 片段通用引物(MOF, MOR)及 HTNV 和 SEOV 的 M 片段特异性引物(HTNMF, HTNMR, SEOMF, SEOMR),应用 Nest - PCR 进行扩增,回收阳性扩增产物进行基因序列测定,将所测基因序列与国内外 HV 病毒株序列进行核苷酸同源性分析,构建 M 基因种系进化树。**结果** 出血热特异性抗体阳性的病例中扩增出 HTN 型 19 份,抗体阴性的病例中扩增出 HTN 型 1 份、SEO 型 1 份。总体来看黑龙江省流行的汉坦病毒毒株主要为 HTN 型和 SEO 型,以 HTN 型为主。经核苷酸及氨基酸同源性和种系进化分析表明其黑龙江地区的病毒株同源性较高,其中 HTN 型与 76 ~ 118 株同源性较高,SEO 型与 Z37 株的同源性较高。**结论** 黑龙江省的 HV 感染病例多为 HTN 型,与其他 GenBank 中的各地标准株的核苷酸及推导的氨基酸序列均有一定差异,在系统进化树中分析 HTN 型与 76 - 118 株较为接近。SEO 型与国内 Z37 较为接近。结合临床症状发现其临床症状较为相似的在系统进化发生树中较为接近。

关键词 肾综合征出血热 汉坦病毒 M 基因 分型 种系进化

[中图分类号] R512.8

[文献标识码] A

Study on the Genotypes and Sequence Characteristics of Hanta Virus. Sheng Xin, Chen Suhong, Lan Yinghua, Chen Guolin, Guo Wei, Wang Kaili, Li Yongguo. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Department of Infectious Diseases, Heilongjiang 150001, China

Abstract **Objective** To study the genotypes and sequence characteristics of hantavirus carried by patients of HFRS in Heilongjiang province. **Methods** Whole blood from 60 patients with the clinical diagnosis of HFRS was collected. All cases were tested with gold standard assay, 40 cases of which were positive, 20 cases negative. Then the Hantaviruses RNA from the blood clots were extracted. Genotyping Hantaviruses in Heilongjiang was Analyzed using RT - Nest - PCR and gene sequencing. The universal primers of hantavirus M gene (MOF, MOR) and the M gene - specific primers of HTNV and SEOV (HTNMF, HTNMR; SEOMF, SEOMR) were designed and used in Nest - PCR. All products were collected and completed sequencing. A nucleotide homology analysis was done on the gene sequence and the other HV sequence, and phylogenetic tree of M gene was built. **Results** Totally 19 cases of HFRS antibody positive and 1 case of HFRS antibody negative were amplified by HTN genotype specific primes successfully. 1 case of HFRS antibody negative was amplified by SEO genotype specific primers. Generally, the hantavirus strains were mainly HTN and SEO genotype in Heilongjiang province, and HTN genotype mostly. The results of homology analysis of nucleotides and amino acid and the Phylogenetic tree indicated that the virus strains in Heilongjiang province were highly homogenous. Compared to the strains in the GenBank of other area, the HTN and the strain 76 - 118 were high homology, and so were the SEO and Z37. **Conclusion** Most HV infections in Heilongjiang Province were caused by

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700700);中国博士后基金资助项目(20100471095);黑龙江省青年科学技术专项基金资助项目(QC07C68)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院感染一科(盛欣、兰英华、陈国林、郭伟、李用国);黑龙江省疾病预防控制中心(陈淑红、王开利)

通讯作者:兰英华,电子信箱:lan_yinghua@163.com