· 实验研究 ·

miR-155 对喉鳞状细胞癌 Hep2 细胞增殖影响及机制

王轶, 周玉琳, 覃泽平

摘　要: 目的　探讨 miR-155 对喉鳞状细胞癌 Hep2 细胞增殖影响及具体机制。**方法**　采用 miR-155 NC 和 miR-155 inhibitor 转染 Hep2 细胞, realtime-PCR 法检测转染效果, 细胞计数盒 - 8 (CCK-8) 法检测不同转染时间 (12、24、36、48、60、72 h) 细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期; Western blot 检测 Hep2 细胞中细胞周期蛋白 A1 (cyclin A1)、cyclin D1、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/叉形头转录因子 (Foxo3a) 信号通路相关蛋白表达量。**结果**　miR-155 inhibitor 组中 miR-155 表达量 (0.34 ± 0.03) 明显低于 miR-155 NC 组 (1.25 ± 0.10), 且转染 24、36、48、60、72 h 后, miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞活力明显低于 miR-155 NC 组; 与 miR-155 NC 组比较, miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞凋亡率明显提高, 细胞周期阻滞于 G1 期, cyclin A1、cyclin D1、PI3K、p-AKT 表达下调, Foxo3a 表达上调, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。**结论**　miR-155 表达下调可降低 Hep2 细胞活力、增加细胞凋亡率, 其机制可能与 miR-155 调控 PI3K/AKT/Foxo3a 信号通路有关。

关键词: miR-155; 喉鳞状细胞癌; Hep2 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R 114　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2017)07-1070-05　DOI: 10.11847/zgggws2017-33-07-10

Effect and mechanism of miR-155 on proliferation of laryngeal squamous cell carcinoma Hep2 cell line

WANG Yi, ZHOU Yu-lin, QIN Ze-ping (*Department of Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Chuanbei Medical College, Nanchong, Sichuan Province* 637000, China)

Abstract: Objective　To explore effect and mechanism of microRNA-155 (miR-155) on the proliferation of laryngeal squamous cell carcinoma Hep2 cells. **Methods**　Hepatocellular carcinoma Hep2 cells were transfected with miR-155 NC and miR-155 inhibitor with liposomes. The expression of miR-155 was detected with realtime-PCR. The viability of the cells with different transfection time (12, 24, 36, 48, 60, and 72 hours) was detected with Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. Cell apoptosis and cell cycle were determined with flow cytometry. The expressions of cell cycle protein A1 (cyclinA1), cell cycle protein D1 (cyclinD1), phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) / protein kinase B (AKT), and forkhead box 3a (Foxo3a) signal pathway related proteins were detected with Western blot. **Results**　The expression of miR-155 in the Hep2 cells transfected with miR-155 inhibitor was obviously lower than that in the cells transfected with miR-155 NC (0.34 ± 0.03 vs. 1.25 ± 0.10) and the viability of Hep2 cells transfected with miR-155 inhibitor was lower than that of cells with miR-155 NC 24, 36, 48, 60, and 72 hours after the transfection. Compared to those transfected with miR-155 NC, the Hep2 cells transfected with miR-155 inhibitor showed significantly increased apoptotic rate, the cell cycle arrested in G1, significantly down-regulated expressions of cyclinA1, cyclinD1, PI3K and p-AKT, and significantly up-regualated expression of Foxo3a (all $P < 0.01$). **Conclusion**　miR-155 inhibitor could affect the proliferation and apoptosis of Hep2 cells and the effects may relate to the regulation of PI3K/AKT/Foxo3a signal pathway.

Key words: microRNA-155; laryngeal squamous cell carcinoma; Hep2 cell; proliferation; apoptosis

喉癌是发生于上皮细胞的一种头颈部常见恶性肿瘤, 在耳鼻咽喉科肿瘤中位列第 3 位, 近年来发病率呈上升趋势[1]。其中喉鳞状细胞癌 (laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC) 是喉癌最常见的病理类型, 占 >90%。迄今为止, LSCC 的病因及发病机制尚不清楚, 空气污染、吸烟饮酒、病毒感染、遗传变异等因素可能是 LSCC 发生的原因, 其中抑癌基因的失活与癌基因的激活是主要的病因之一[2-3]。miRNA 是一类高度保守的长度约为 22 nt 非编码 RNA 分子, 被认为是一类新型的癌基因或者抑癌基因, 并且 miRNA 芯片研究表明多种 miRNA 是 LSCC 预后及诊断的独立影响因子, 在 LSCC 发生发展中起着癌基因或者抑癌基因作用[4-6]。miR-155 是一个典型的多功能基因, 可通过与下游靶基因如磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/叉形头转录因子 (forkhead box 3a, Foxo3a)、ras 同源物基因家族成员 A (Ras homolog gene family member A, RhoA) 的 mRNA3' 非编码区结合, 进而参与造血干细胞、免疫反应、炎症反应、肿瘤发生等生物学过程[7-8]。研究表明 miR-155 在乳腺癌、肺癌、结肠癌、肝癌、喉癌等多种肿瘤中高表达, 并且在其中起着癌基因的作用[7,9]。但是对于 miR-155 在喉癌中的具体作用机制尚不清楚, 因此本研究通过脂质体转染 miR-155 inhibitor, 探讨 miR-155 表达下调后对 LSCC 细胞 Hep2 增殖

作者单位: 川北医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川 南充 637000
作者简介: 王轶 (1974 -), 男, 四川南充人, 副主任医师, 博士, 研究方向: 耳鼻咽喉临床。
数字出版日期: 2017 - 6 - 30 9:41
数字出版网址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20170630.0941.008.html

中国公共卫生 CPH

的影响及机制。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　LSCC 细胞 Hep2(中国科学院细胞库);兔抗细胞周期蛋白 A1(cell cycle protein A1, cyclinA1)、cyclinD1、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)、蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)、p-AKT、Foxo3a 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体(美国 Epitmics 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)、细胞计数试剂盒-8(Cell Counting Kit-8, CCK-8)试剂盒、annexin V/propidium iodide 流式双染试剂盒、细胞周期检测试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);胎牛血清、改良杜氏伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)培养基、胰蛋白酶(美国 Gbico 公司);miR-155 inhibitor 及阴性对照(miR-155 NC)(上海吉玛生物有限公司);trizol 试剂盒、一步法 RT-PCR 试剂盒、Lipofectamine 2000(大连宝生生物技术有限公司)。FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);迷你双垂直电泳仪、迷你转印电泳仪、ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2　miRNA 转染　无血清 Opti-MEM® I 培养基稀释 miR-155 NC、miR-155 inhibitor 及 Lipofectamine 2000,将两者混匀,室温孵育 20~30 min;将 miRNA/Lipofectamine 2000 复合物加入 6 孔板培养;6 h 以后换成含 10% 血清的 DMEM 培养基,并用 realtime-PCR 检测 miR-155 的表达。

1.3　miR-155 表达检测　采用 realtime-PCR 法,将 1×10^4 个 Hep2 细胞接种于 6 孔板,转染 48 h 后,收集细胞;根据 trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,采用微量紫外分光光度计检测 RNA 纯度,通过一步法 RT-PCR 试剂盒逆转录 RNA,进行 realtime-PCR 扩增,扩增结果利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。miR-155 上游引物:5′-TAATGCTAATCGTGATAGGG-3′,下游:5′-TTTGGCACTAGCACATT-3′,GAPDH 上游引物:5′-AGCCACATCGCTCAGACA-3′,下游:5′-TGGACTCCACGACGTACT-3′;每组设 3 个平行孔。

1.4　指标与方法

1.4.1　细胞活力检测　采用 CCK-8 法,将 5×10^3 个 Hep2 细胞接种于 96 孔板,分别转染 12、24、36、48、60、72 h 后,加入 CCK-8,继续培养 4 h 后,于酶标仪 570 nm 处测吸光度(A)值,代表细胞活力。

1.4.2　细胞凋亡检测　采用 annexin V/PI 流式双染法,将 1×10^4 个 Hep2 细胞接种于 6 孔板,转染 48 h 后,收集细胞,按顺序分别加入结合液,annexin V 及碘化丙啶,于 1 h 内在流式细胞仪上检测细胞凋亡情况。

1.4.3　细胞周期检测　采用流式细胞术,将 1×10^4 个 Hep2 细胞接种于 6 孔板,转染 48 h 后,收集细胞,加入 5 μL 终浓度为 10 mg/mL 的 Rnase,37 ℃孵育 1 h,再加入碘化丙啶染液,室温下避光染色 30 min,用流式细胞仪进行细胞周期检测。

1.4.4　PI3K/AKT/Foxo3a 信号通路相关蛋白表达检测　采用 Western blot 法,将 1×10^4 个 Hep2 细胞接种于 6 孔板,转染 48 h 后,收集细胞,加入细胞裂解液裂解 30 min,离心,小心吸取上清,即可获得总蛋白。根据试剂盒法测定蛋白浓度;蛋白变性,上样,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳,湿法转膜 30~50 min;一抗溶液(兔抗 cyclinA1、cyclinD1、PI3K、AKT、p-AKT、Foxo3a 及 GAPDH 单克隆抗体),稀释度为 1∶100)孵育,4 ℃过夜;次日二抗溶液室温孵育 1~2 h;在凝胶成像系统中曝光,用 Quantity one 软件分析各抗体条带灰度值。

1.5　统计分析　数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

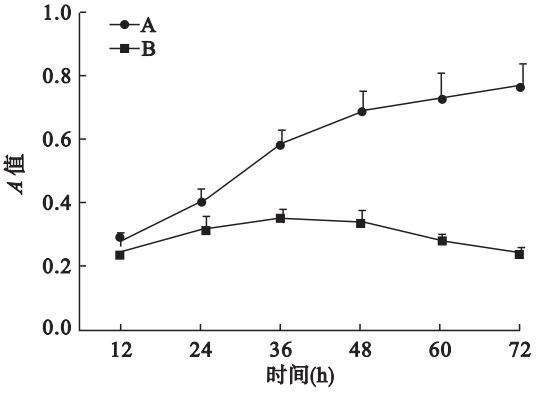
2.1　miR-155 inhibitor 在 Hep2 细胞中转染效果　Realtime-PCR 结果显示,miR-155 NC 组与 miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞中 miR-155 表达量分别为(1.25±0.10)、(0.34±0.03);与 miR-155 NC 组比较,miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞中 miR-155 表达量明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。提示,Hep2 细胞转染 miR-155 inhibitor 成功。

2.2　miR-155 inhibitor 对 Hep2 细胞活力影响(图 1)　Hep2 细胞转染 miR-155 NC 及 miR-155 inhibitor 24 h 后,与 miR-155 NC 组比较,miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞活力明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3　miR-155 inhibitor 对 Hep2 细胞凋亡影响(图 2)　结果显示,miR-155 NC 组 Hep2 细胞早期、晚期凋亡率分别为(3.49±0.38)%、(5.84±0.58)%,miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞早期、晚期凋亡率分别为(12.43±1.20)%、(18.96±1.85)%;与 miR-155 NC 组比较,miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞早、晚期凋亡率均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。

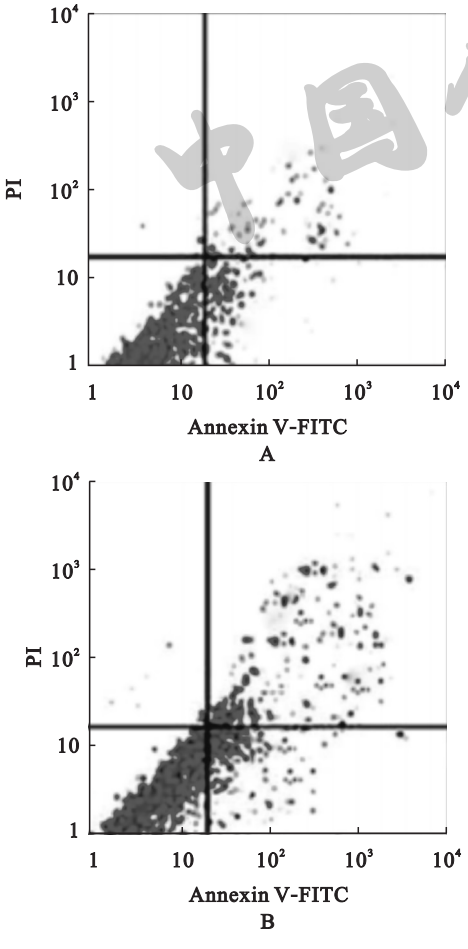
2.4　miR-155 inhibitor 对 Hep2 细胞周期影响(表 1)　与 miR-155 NC 组比较,miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞 G1 期比例明显增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。提示,miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞周期阻滞在 G1 期。

中国公共卫生 CPH



注：A：miR-155 NC 组；B：miR-155 inhibitor 组；与 miR-155 NC 组比较，a $P<0.01$。

图 1　miR-155 inhibitor 对 Hep2 细胞活力影响（CCK-8）



注：A：miR-155 NC 组；B：miR-155 inhibitor 组。

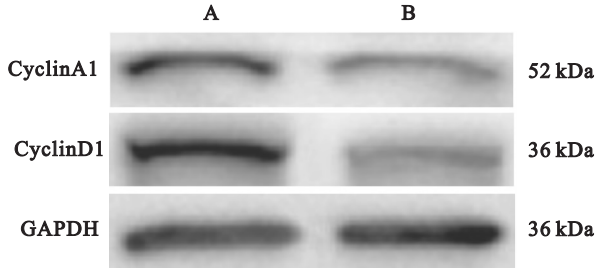
图 2　miR-155 inhibitor 对 Hep2 细胞凋亡影响

表 1　miR-155 inhibitor 对 Hep2 细胞周期影响（$\bar{x}\pm s, n=3$）

组别	G1 期	S 期	G2 期
miR-155 NC 组	47.36 ± 4.88	26.63 ± 2.66	26.01 ± 2.53
miR-155 inhibitor 组	65.58 ± 6.56[a]	18.46 ± 1.84[a]	15.96 ± 1.60[a]

注：与 miR-155 NC 组比较，a $P<0.01$。

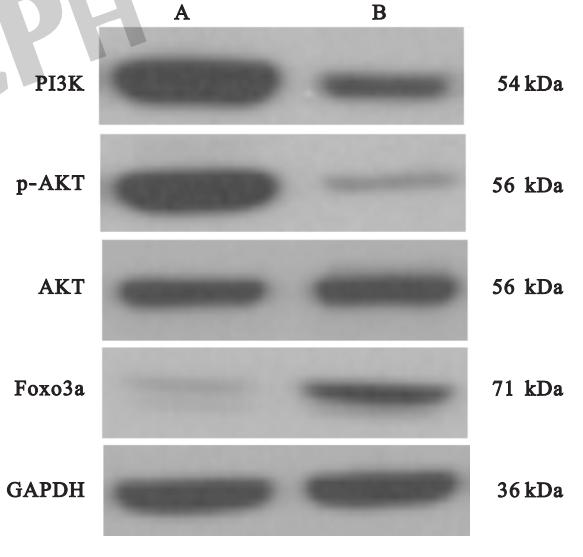
2.5　miR-155 inhibitor 对 Hep2 细胞中周期蛋白表达影响（图 3）　miR-155 NC 组 Hep2 细胞中 cyclinA1 与 cyclinD1 表达量分别为（0.47 ± 0.05）、（0.88 ± 0.10），miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞中 cyclinA1 与 cyclinD1 表达量分别为（0.18 ± 0.02）、（0.17 ± 0.02）；与 miR-155 NC 组比较，miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞中 cyclinA1 及 cyclinD1 表达量下调，差异均有统计学意义（均 $P<0.01$）。



注：A：miR-155 NC 组；B：miR-155 inhibitor 组。

图 3　miR-155 inhibitor 对 Hep2 细胞周期蛋白表达影响

2.6　miR-21 对 Hep2 细胞中 PI3K/AKT/Foxo3 信号通路影响（图 4、表 2）　与 miR-155 NC 组比较，miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞中 PI3K、p-AKT表达量下调，Foxo3a 表达量上调，差异均有统计学意义（均 $P<0.01$）。



注：A：miR-155 NC 组；B：miR-155 inhibitor 组。

图 4　miR-155 inhibitor 对 Hep2 细胞中 PI3K/AKT/Foxo3a 信号通路影响

表 2　miR-155 inhibitor 对 Hep2 细胞 PI3K/AKT/Foxo3a 信号通路相关蛋白表达影响（$\bar{x}\pm s, n=3$）

组别	PI3K	p-AKT	Foxo3a
miR-155 NC 组	1.34 ± 0.13	1.22 ± 0.12	0.14 ± 0.01
miR-155 inhibitor 组	0.35 ± 0.03[a]	0.17 ± 0.01[a]	0.35 ± 0.03[a]

注：与 miR-155 NC 组比较，a $P<0.01$。

3　讨　论

miRNA 是一类真核生物中高度保守的非编码 RNA 分子，通过与靶基因的 3'-非翻译区特异性结

中国公共卫生 CPH

合,降解靶基因或者抑制靶基因转录,从而调控细胞增殖、凋亡、细胞周期、迁移、侵袭等生物学行为[4-6]。自 1993 年 Lee 等在线虫中发现了第 1 个 miRNA(lin-4)后,2002 年 Groce 也首次报道了 miRNA 与肿瘤的关系,即在慢性淋巴细胞白血病中 miR-15 及 miR-16 表达下调或缺失。后续 miRNA 与肿瘤的关系引起了广泛兴趣。研究显示头颈部肿瘤组织拥有自己独特的 miRNA 表达特征及其靶基因,可通过这些 miRNA 及其靶基因的调控,进而为肿瘤诊断、治疗及预后提供理论依据[10-11]。其中 miR-155 是一种常见的在多种肿瘤组织中被认为癌基因的 miRNA,位于人染色体 21q21,是由癌基因-B 细胞整合簇(BIC)基因编码产生的,能通过介导 Foxo3a、RhoA 等多种靶基因表达参与造血干细胞、骨髓干细胞、炎症反应、免疫反应及肿瘤的发生发展过程[7-9]。miR-155 在包括 LSCC 在内的多种肿瘤组织中高表达,如 Wang 等[12]利用 RT-PCR 法检测 280 例 LSCC 患者及 560 名年龄、性别相匹配的健康对照,结果表明 LSCC 组织中 miR-155 远高于健康对照,曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.933,敏感度为 82.6%,特异性为 89.2%,而且 LSCC 患者血浆中 miR-155 表达量也显著高于健康对照,AUC 为 0.757,敏感度为 58.4%,特异性为 69.5%。研究还表明 miR-155 inhibitor 能明显抑制 Hep2 细胞增殖与迁移,并诱导细胞凋亡[13]。

本研究利用脂质体转染 miR-155 inhibitor 及 miR-155 NC,并采用 realtim PCR 检测转染效果,结果表明 miR-155 inhibitor 可明显下调 Hep2 细胞中 miR-155 表达,表明 miR-155 inhibitor 转染成功。本研究结果显示,在转染 24、36、48、60、72 h 后,miR-155 inhibitor 组 Hep2 细胞活力降低,细胞凋亡率明显增加,与王洋等[13]研究结果一致。提示,miR-155 inhibitor 对 Hep2 细胞活力具有抑制作用,对于细胞的凋亡具有诱导作用。肿瘤细胞的无限增殖来源于细胞周期的不可控制,通过调控细胞周期可一定程度的遏制肿瘤细胞的无限生长。而且细胞周期调控点是常见的抗肿瘤药物靶点,如 G1 期、G2 期等[14-15]。CyclinA1、cyclinD1 是与 G1 期密切相关的细胞周期蛋白,其表达量上调,能加速 G1 进入 S 期,进而促进细胞的复制与分裂。本研究结果表明 miR-155 inhibitor 转染可使 Hep2 细胞周期阻滞在 G1 期,并下调 cyclinA1、cyclinD1 表达,进而遏制 Hep2 细胞的增殖。

细胞的增殖与凋亡受到多种信号通路调控,PI3K/AKT 信号通路则是其中一种,在众多信号通路中发挥着重要作用,参与细胞增殖、凋亡、细胞周期、能量代谢、基因转录等生物学过程[16-17]。在恶性肿瘤组织中 PI3K/AKT 信号通路被异常激活,反过来促进恶性肿瘤的发展,因而抑制 PI3K/AKT 信号通路能够促使肿瘤细胞的生长增殖受到抑制并发生程序性死亡[16-17]。当 PI3K 受外部信号刺激后,将信号传递给 AKT,磷酸化的 AKT 转入细胞核,下调下游多种细胞因子表达,Foxo3a 则是其中一种。Foxo3a 是叉头转录因子家族的一员,具有鲜明的叉头 DNA 结合域,能被 AKT、血清和糖皮质激素调节蛋白激酶(serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK)等蛋白激酶激活,后转入细胞质中,进而失去对细胞凋亡调控的能力。同时 Foxo3a 亦是 miR-55 的下游靶基因之一,miR-155 对 PI3K/AKT 信号通路同样具有调控作用[18-20]。本研究结果表明 miR-155 inhibitor 转染可明显下调 PI3K、p-AKT 表达,上调 Foxo3a 蛋白表达。提示,miR-155 inhibitor 转染对 Hep2 细胞增殖具有抑制作用、对细胞凋亡具有促进作用,其机制可能与 miR-155 表达下调抑制 PI3K/AKT 信号通路、上调 Foxo3a 表达有关。

参考文献

[1] 汤玮晶,陶磊. 喉癌患者术后生存质量的研究进展[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志,2014,14(2):124-126.

[2] 王蓓蕾,徐立红,袁晖,等. 喉癌相关基因的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2014,36(9):1323-1330.

[3] 朱奕,王胜资. 吸烟相关性喉癌发生机制的研究进展[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志,2015,15(3):213-215.

[4] Cybula M, Józefowicz W, Korczyńska M, et al. New miRNA expression abnormalities in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2016, 16(4):559-568.

[5] Zhang Y, Chen Y, Yu J, et al. Integrated transcriptome analysis reveals miRNA-mRNA crosstalk in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Genomics, 2014, 104(4):249-256.

[6] 吴一波,沈志森,余星,等. 喉癌相关 miRNA 的研究进展[J]. 基础医学与临床,2012,32(5):583-586.

[7] Jurkovicova D, Magyerkova M, Kulcsar L, et al. miR-155 as a diagnostic and prognostic marker in hematological and solid malignancies[J]. Neoplasma, 2014, 61(3):241-251.

[8] Seddiki N, Brezar V, Ruffin N, et al. Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease[J]. Immunology, 2014, 142(1):32-38.

[9] 蔡婷婷,王菊勇,杜志华,等. microRNA-155 与恶性肿瘤的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2016,24(14):2314-2318.

[10] Hudcova K, Trnkova L, Kejnovska I, et al. Novel biophysical determination of miRNAs related to prostate and head and neck cancers[J]. Eur Biophys J, 2015, 44(3):131-138.

[11] Salazar C, Nagadia R, Pandit P, et al. A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers[J]. Cell Oncol (Dordr), 2014, 37(5):331-338.

[12] Wang JL, Wang X, Yang D, et al. The Expression of micro RNA-155 in plasma and tissue is matched in human laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Yonsei Med J, 2016, 57(2):298-305.

[13] 王洋,王斌全,高伟,等. MicroRNA-155 对喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞株的作用[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2013,20(6):285-289.

[14] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer[J]. Cell Prolif, 2003, 36(3):131-149.

[15] 李煜,孔祥文,楼永军,等. 癌症研究与临床治疗中的 CDK 抑制剂[J]. 中国现代应用药学,2014,31(9):1147-1154.

[16] Zhao HF, Wang J, Tony TS. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt

and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: alliance or contradiction? (Review)[J]. Int J Oncol, 2015, 47(2): 429 – 436.
[17] Toren P, Zoubeidi A. Targeting the PI3K/Akt pathway in prostate cancer: challenges and opportunities (review)[J]. Int J Oncol, 2014, 45(5): 1793 – 1801.
[18] Zhuang Z, Qin X, Hu H, et al. Down-regulation of micro RNA-155 attenuates retinal neovascularization via the PI3K/Akt pathway[J]. Mol Vis, 2015, 21: 1173 – 1184.
[19] Min M, Peng L, Yang Y, et al. MicroRNA-155 is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis by targeting FOXO3a[J]. Inflamm Bowel Dis, 2014, 20(4): 652 – 659.
[20] Ling N, Gu J, Lei Z, et al. microRNA-155 regulates cell proliferation and invasion by targeting FOXO3a in glioma[J]. Oncol Rep, 2013, 30(5): 2111 – 2118.

收稿日期: 2017-02-10 (解学魁编辑 郭薇校对)

· 检验技术 ·

登革 -2 型病毒一步法 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法建立*

牟小会[1], 郑祎扬[2], 韦艳[2], 颜凤[1], 程金芝[1], 吕清巧[1], 商正玲[3], 吴家红[1]

摘 要: 目的 建立一种针对登革 2 型病毒(DENV-2)的快速、灵敏、特异的检测方法。**方法** 从 GenBank 下载 105 株 DENV-2 病毒毒株全基因序列, 应用生物软件 Bioedit 进行比对分析筛选出保守序列, 在保守区域设计特异引物和探针, 建立检测 DENV-2 的 TaqMan 荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法。**结果** 该方法检测灵敏度达到 10^2 copies/μL; 特异性验证中除登革 2 型病毒有明显扩增外, 与墨累谷脑炎病毒、西尼罗病毒、蜱传脑炎病毒、登革病毒 1、3、4 型、黄热病毒和科萨努尔森林病毒、乙型脑炎病毒均无交叉反应。重复性实验结果表明该方法的组间和组内的变异系数(CV)均 <2%。对人工感染 DENV-2 的 87 只蚊虫标本进行比对实验, 结果荧光定量 RT-PCR 检测出 56 份阳性, 传统 RT-PCR 只检测出 16 份阳性, 差异有统计学意义(χ^2 = 37.908, P = 0.000)。**结论** TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法检测 DENV-2, 特异性强、敏感性高。

关键词: 登革 2 型病毒(DENV-2); TaqMan 荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR); 检测; 标准品
中图分类号: R 373.3 **文献标志码**: A **文章编号**: 1001-0580(2017)07-1074-05 DOI: 10.11847/zgggws2017-33-07-11

Development and evaluation of TaqMan-based one-step reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of dengue virus type 2

MOU Xiao-hui*, ZHENG Yi-yang, WEI Yan, et al (*Laboratory for Modern Pathogen Biology, Basic Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province* 550025, China)

Abstract: Objective To develop a TaqMan-based reverse transcription-polymerase chain reaction assay (RT-PCR) for the detection of dengue virus type 2 (DENV-2). **Methods** The whole genome sequences of DENV-2 were downloaded from the GenBank and aligned with the Bioedit software. Specific primers and probes were designed on the conserved region of DENV-2 based on the alignment results to develop a TaqMan-based RT-PCR assay. **Results** The detection limit of the assay was 10^2 copies/μL. Besides the obvious amplification of DENV-2, there were no cross reactions with Murray Valley encephalitis virus, Japanese encephalitis virus, West Nile virus, tick-borne encephalitis virus, other types of dengue virus, yellow fever virus, and Kyasanur Forest disease virus. The results of the stability assay showed that the between- and within-group coefficient of variation were less than 2%. For the 87 mosquito specimens detected with two different methods, 56 positive samples were confirmed with fluorescence quantitative RT-PCR, while only 16 positive samples were confirmed with the traditional RT-PCR method, with a significant difference (χ^2 = 37.908, P = 0.000). **Conclusion** The developed TaqMan-based one-step reverse transcription-polymerase chain reaction assay is of strong specificity and high sensitivity for molecular diagnosis of DENV-2.

Key words: dengue virus type 2; TaqMan real-time reverse transcription-PCR; detection; standard substance

登革病毒(dengue virus, DENV)是黄病毒科黄病毒属的单链 RNA 病毒, 根据病毒抗原特异性分为登革 Ⅰ ~ Ⅳ 4 个血清亚型[1]。主要通过埃及伊蚊传播到人群, 所致疾病主要有登革热(dengue

* **基金项目**: 贵州省科技厅基础平台建设项目(黔科平台[2012(4006)]); 贵州省社会发展科技公关项目(黔科合 SY 字[2009]3056)
作者单位: 1. 贵州医科大学基础医学院现代病原生物学实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学教研室; 3. 贵州医科大学基础医学院免疫学教研室
作者简介: 牟小会(1989 –), 女, 贵州安顺人, 硕士在读, 研究方向: 病媒生物防控与虫媒病。
通讯作者: 吴家红, E-mail: 657490050@qq.com
数字出版日期: 2016 – 9 – 6 15:12
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160906.1512.060.html