

· 论 著 ·

HBV 病毒蛋白在 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU 小鼠中的表达

瞿晓渊¹, 巴月², 熊俊¹, 张树忠¹, 姚玉成¹, 张南¹, 李建秀¹, 王新民¹, 马风云¹, 叶煦亭¹, 丛文铭³, 胡以平^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室, 上海 200433; 2. 郑州大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 郑州 450052; 3. 第二军医大学东方肝胆外科医院病理科, 上海 200438)

[摘要] **目的:**分析 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系转基因小鼠血清和组织中病毒蛋白的表达及其特征。**方法:**以 138 只 F6~F17 代 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系的转基因小鼠为研究对象,采用血清 ELISA 检测和免疫组织化学的方法分析病毒蛋白在转基因小鼠中的表达。**结果:**转基因小鼠血清中 HBsAg 和 HBeAg 的阳性率分别为 55.18% 和 25.00%,血清中 HBsAg 的出现时间多在 3 个月龄之前(占 93.33%),且持续时间在 9 个月以上(占 95.56%),个体之间具有一定差异。转基因小鼠肝组织中至少可检测到一种病毒蛋白,HBsAg、HBcAg 和 X 蛋白的检出率分别为 85.82%、58.24% 和 49.61%。HBsAg 分布于肝细胞质中,HBcAg 和 X 蛋白既可分布于肝细胞核中,也可分布于肝细胞质中。HBsAg 的表达具有细胞特异性(门管区周围的肝细胞)和组织特异性(肝和肾),X 蛋白除在肝脏和肾脏中表达外,还可在脑组织中表达。**结论:**C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系转基因小鼠血清和肝肾等组织中有病毒蛋白的表达,病毒蛋白的分布具有组织细胞特异性和个体差异。

[关键词] 肝炎病毒,乙型;小鼠,转基因;病毒蛋白质类

[中图分类号] R 512.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0275-04

Expression of hepatitis B virus proteins in HBV transgenic mice strain C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU

ZI Xiao-yuan¹, BA Yue², XIONG Jun¹, ZHANG Shu-zhong¹, YAO Yu-cheng¹, ZHANG Nan¹, LI Jian-xiu¹, WANG Xin-min¹, MA Feng-yun¹, YE Xu-ting¹, CONG Wen-ming³, HU Yi-ping^{1*} (1. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Environmental Health, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052; 3. Department of Pathology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438)

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate expression of hepatitis B virus proteins in serum and tissues of C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 transgenic mouse. **Methods:** Totally 138 transgenic mice of C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 strain F6-F17 offspring were used to estimate the expression of hepatitis B virus gene by ELISA and immunohistochemistry. **Results:** HBsAg and HBeAg were expressed in the serum of 55.18% and 25.00% transgenic mice, respectively. Appearance time of serum HBsAg was within 3 months in 93.33% mice and persisted for more than 9 months in most mice(95.56%) with individual difference. HBsAg, HBcAg and X protein were expressed in liver tissue of 85.82%, 58.24% and 49.61% transgenic mice, respectively. Distribution of HBsAg was mainly in cytoplasm of hepatocyte. Furthermore, HBcAg and X protein were expressed in cytoplasm and/or nucleus of hepatocyte. Cell-specific and tissue-specific expression of HBsAg was detected mainly in the hepatocyte near portal area of liver and kidney. Distribution of X protein was found in the liver, kidney and brain. **Conclusion:** C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 transgenic mice express hepatitis B virus proteins in the serum, liver and kidney. The expression is cell-specific and tissue-specific, but has individual difference.

[KEY WORDS] hepatitis B virus; mice, transgenic; viral proteins

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 275-278]

HBV 转基因小鼠是研究 HBV 的生物学、病毒-宿主相互作用、病毒致病机制和开发防治 HBV 的疫苗与药物等方面问题的良好实验动物模型^[1,2]。本实验室已建立并优选培育了一个 *adr* 亚型的 HBV 全基因组转基因小鼠品系: C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系。该转基因小鼠 Founder 个体中整合了双拷贝的全长 HBV 基因组 DNA(*adr* 亚型),病毒基因可转录、表达、复制并可

包装成病毒颗粒^[3,4]。为了实现该品系转基因小鼠的大规模推广应用,就需要了解其在传代培育过程

[基金项目] 国家“九五”攻关项目(TJ99-LA01);国家自然科学基金(39670811);上海市科委基础研究重点项目(03DZ14023);上海市科学技术发展基金(994919033)。

[作者简介] 瞿晓渊(1976-),男(汉族),博士,讲师。

E-mail: xiaoyuanzi2001@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: yphu@smmu.edu.cn

中是否稳定。为此,我们从 DNA、RNA、蛋白质、病毒学、病理学和免疫学角度,全面系统地研究了该品系转基因小鼠的生物学特性。本研究从蛋白质水平对 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系的特性进行了研究,分析该转基因小鼠品系的稳定性,为其作为实验动物模型的推广应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物 乙肝转基因小鼠 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系小鼠和正常 C57BL/6 品系小鼠由本室 SPF 级转基因动物实验室繁殖和提供。

1.2 实验材料 HBsAg ELISA 检测试剂盒购自美国雅培公司,HBcAg ELISA 检测试剂盒和多聚赖氨酸购自华美生物工程公司。羊抗 HBsAg 多抗、兔抗 HBcAg 多抗和鼠抗 X 蛋白单抗购自 DAKO 公司。兔抗羊 UltraSensitive™ 二抗试剂盒、羊抗兔 IgG-HRP 和羊抗鼠 IgG-HRP 购自福州迈新公司。

1.3 血清 ELISA 酶联检测 转基因小鼠后眼眶静脉丛采血 300 μ l,4 $^{\circ}$ C 放置过夜,8 000 \times g 离心 5 min,取血清 100 μ l,按试剂盒说明进行 ELISA 酶联检测,终止反应后 5 min 内用自动酶标仪测 $D_{450/630}$ 值,根据试剂盒说明书结合肉眼观察进行结果判断。每只小鼠每次检测 2 次,取平均值作为该小鼠本次的 $D_{450/630}$ 值。每月检测 1 次,连续观察 3 个月以上。

1.4 免疫组织化学检测 组织取材后,置于 10% 中性甲醛中,4 $^{\circ}$ C 固定 12~24h。按常规方法制作组织切片。制片后采用 SP 法进行免疫组织化学检测,羊抗 HBsAg 多抗按 1:500 稀释,兔抗 HBcAg 多抗按 1:200 稀释,鼠抗 X 蛋白单抗按 1:50 稀释。

1.5 统计学处理 实验结果采用 SPSS11.0 统计分析软件进行分析。

2 结果

2.1 转基因小鼠血清中存在病毒蛋白 10 个月中共对 138 只 PCR 阳性的转基因小鼠^[5]进行了 589 次 HBsAg 检测,结果发现,转基因小鼠血清中 HBsAg 的阳性率为 55.18% (325/589)。对上述 138 只小鼠中的 76 只进行了 HBeAg 的检测,结果阳性率为 25.00% (19/76) (图 1)。同时发现,血清中 HBsAg 和 HBeAg 的阳性并不同步,同一时间点上,76 只转基因小鼠中仅有 9 只 (11.84%) 可同时检测出 HBsAg 和 HBeAg。而且其 $D_{450/630}$ 值也不同步,HBsAg $D_{450/630}$ 值高者 HBeAg 不一定高。

2.2 转基因小鼠血清中 HBsAg 的分布特点 对

45 只转基因小鼠血清 ELISA 检测结果进行分析表明,不同转基因小鼠之间血清中 HBsAg 的出现时间、阳性程度和持续时间存在明显个体差异,但同一个体血清中 HBsAg 的分布较有规律,相对稳定。从血清中 HBsAg 的出现时间来看,93.33% (42/45) 的转基因小鼠在 3 个月龄之前出现,1、2、3 个月龄时的出现率分别占 46.67% (21/45)、26.67% (12/45) 和 20.00% (9/45)。从 HBsAg 的阳性程度来看,65.34% 的转基因小鼠仅为弱阳性 (+),阳性 (++) 和强阳性 (+++) 的小鼠分别占 16.41% 和 17.23% (图 1),其中个别小鼠其 $D_{450/630}$ 值可达到界值的 3 倍以上。从 HBsAg 的持续时间来看,95.56% (43/45) 的小鼠血清中 HBsAg 的持续时间在 9 个月以上,其中 15.56% (7/45) 的转基因小鼠在 15 个月龄以上时,血清中仍可检测到 HBsAg,持续时间大于 12 个月,个别小鼠血清中 HBsAg 的持续时间可达到 2 年;55.56% (25/45) 的转基因小鼠在 13~15 个月龄时,血清中 HBsAg 转阴,持续时间在 12 个月左右;24.44% (11/45) 的小鼠在 10~12 个月龄时转阴,持续时间在 9 个月左右;仅 4.44% (2/45) 的小鼠在 12 个月龄之前就转阴,血清中 HBsAg 持续时间较短,约在 5~6 个月左右。

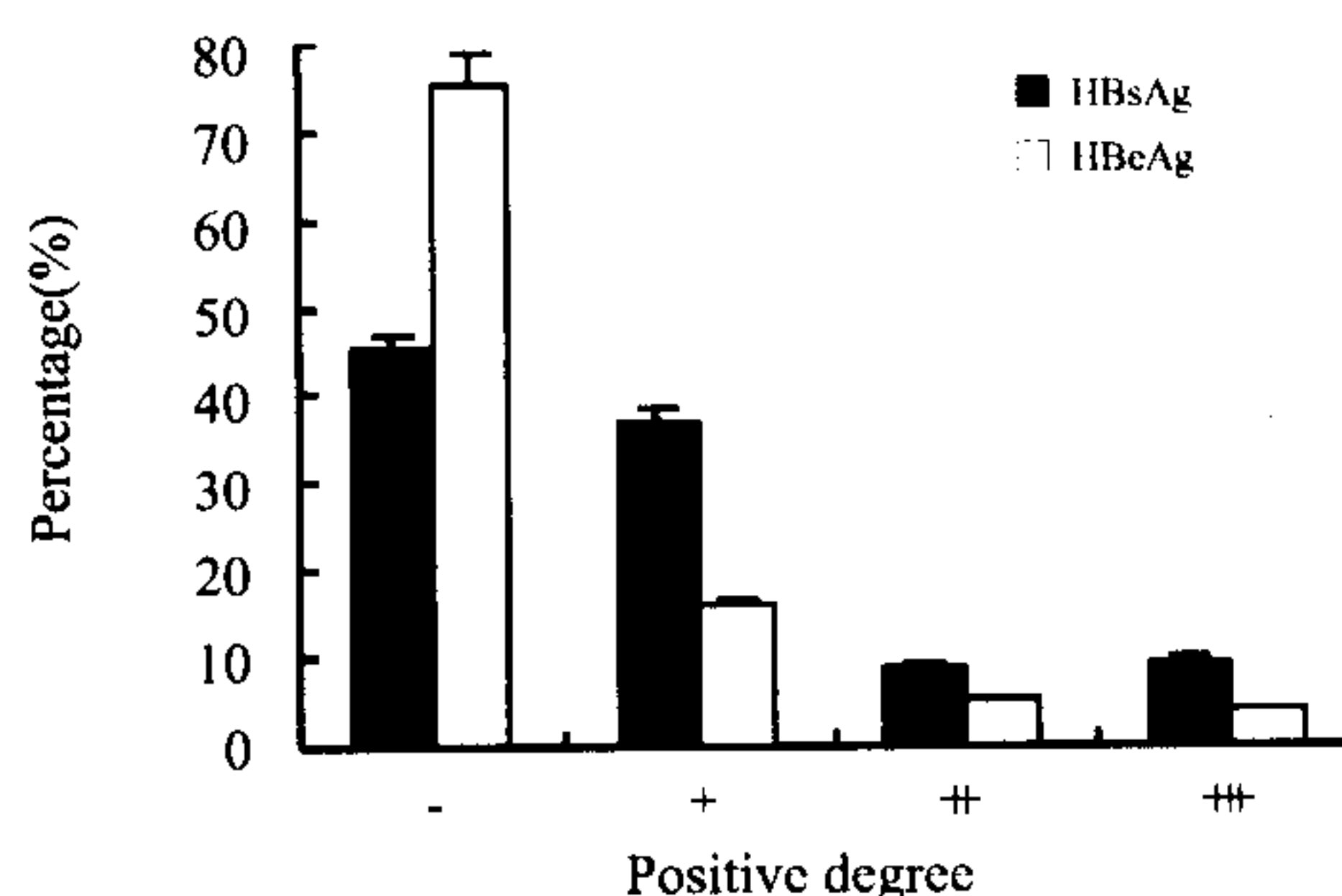


图 1 转基因小鼠血清中 HBsAg 和 HBeAg 的表达

Fig 1 Expression of HBsAg and HBeAg in serum of transgenic mice

2.3 肝组织中 HBsAg、HBcAg 和 X 蛋白的检出率 对上述 138 只小鼠肝组织进行免疫组化分析,检测肝组织中 HBsAg、HBcAg 和 X 蛋白的表达情况,结果发现 PCR 阳性的小鼠其肝组织中至少可检测到一种病毒蛋白,HBsAg、HBcAg 和 X 蛋白的检出率分别为 85.82% (115/134)、58.24% (53/91) 和 49.61% (63/127)。进一步分析 82 只免疫组化阳性的小鼠肝组织中 3 种病毒蛋白的表达情况,结果发现,29.27% (24/82) 的转基因小鼠同时表达 HBsAg、HBcAg 和 X 蛋白;39.02% (32/82) 的小鼠同时表达 2 种病毒蛋白,多为 HBsAg 和 HBcAg 同

时表达(75.00%, 24/32); 31.71%(26/82)的小鼠仅1种病毒蛋白表达,且73.08%(19/26)为HBsAg表达(图2)。表明该品系转基因小鼠中整合的HBV DNA可在肝组织中表达,但HBsAg、HBcAg和X蛋白的表达不同步,HBsAg在肝组织中优先表达。

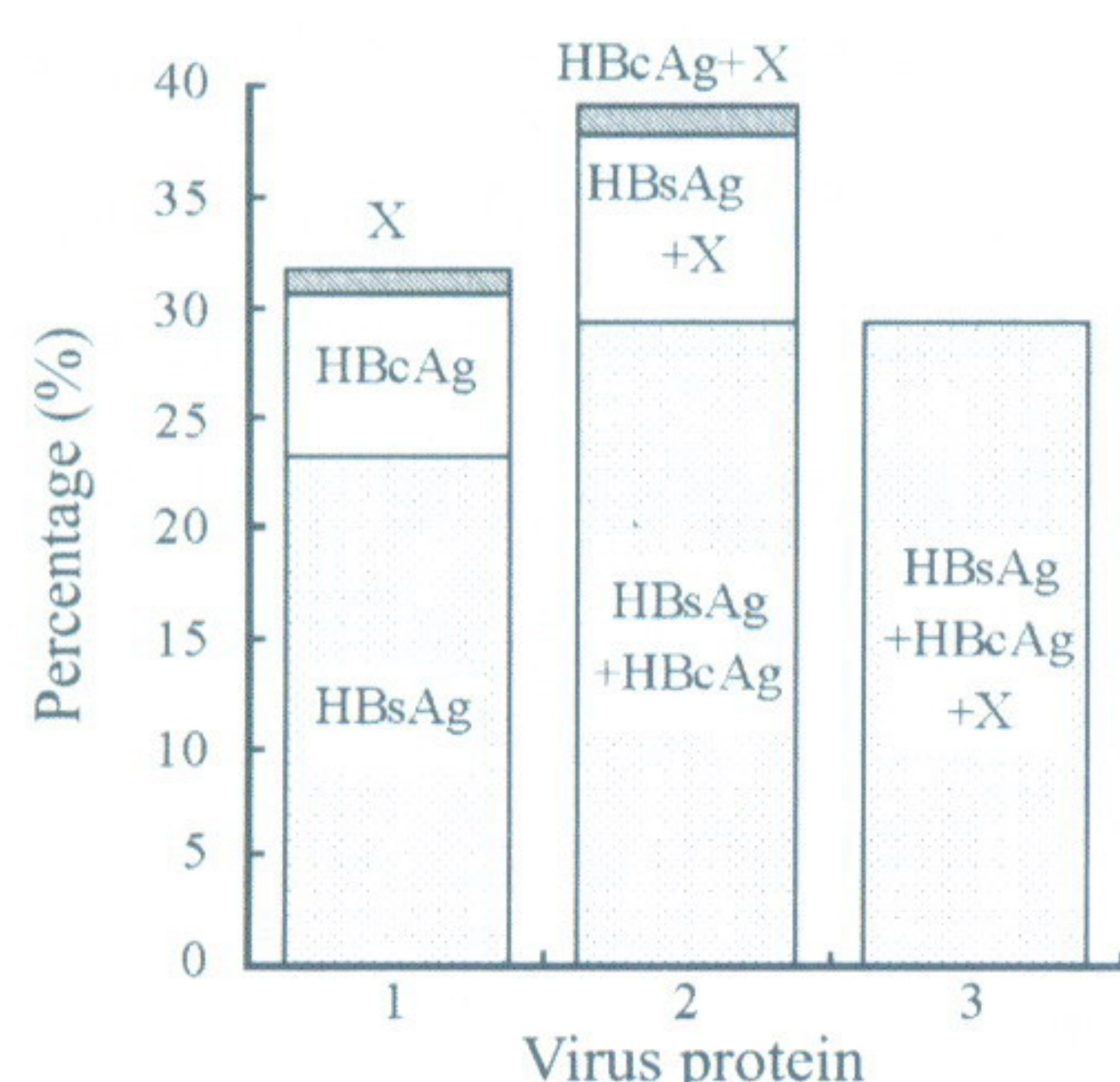


图2 转基因小鼠肝组织中各种病毒蛋白的表达情况

Fig 2 Expression of virus proteins in the liver of transgenic mice

2.4 肝组织中HBsAg、HBcAg和X蛋白的分布特点 免疫组化分析发现,转基因小鼠肝组织中,3种病毒蛋白阳性的肝细胞在分布方式、位置、数量和强度上有各自特征:HBsAg的分布以胞质型为主;阳性细胞的分布很不均匀,主要有3种分布方式:单个阳性细胞散在分布、大片阳性细胞中夹杂少数阴性细胞、集落样分布;阳性细胞在汇管区周围和小叶

间静脉周围较常见;阳性肝细胞数多在40%以内,个别可达到70%;阳性的强度可强可弱。HBcAg多呈核型分布,也可呈胞质型或核质混合型分布;阳性细胞以单个阳性细胞散在分布为主;阳性肝细胞数多在20%以内,个别可达到50%;胞质型分布的肝细胞阳性程度较弱。X蛋白的分布与HBcAg相似,多呈核型,也可呈胞质型,少数呈核质混合型;胞质型阳性细胞以单个散在分布为主,核型阳性细胞以成片分布为主;胞质阳性的肝细胞数多较少,在20%以内,核阳性的肝细胞数多较多,最多可达到85%以上;阳性程度强弱不一。这些表明转基因小鼠肝组织中病毒蛋白的表达具有一定的细胞特异性。

2.5 病毒蛋白表达的组织特异性 随机挑取5只血清和肝组织HBsAg均阳性的小鼠,取其肝、脾、肾、心、肺、脑、肠、胃、肌肉和皮肤等组织进行免疫组化分析,检测各组织中HBsAg和X蛋白的表达情况。结果发现,HBsAg和X蛋白在肝组织中高表达,阳性细胞数在40%左右;肾脏和脾脏中有少数细胞表达HBsAg和X蛋白,且阳性程度较弱;在脑组织中,几乎所有的细胞核(>95%)均表达X蛋白(图3);其他组织HBsAg和X蛋白均阴性(照片未显示)。表明转基因小鼠中HBsAg和X蛋白的表达具有组织特异性,嗜肝性很强。

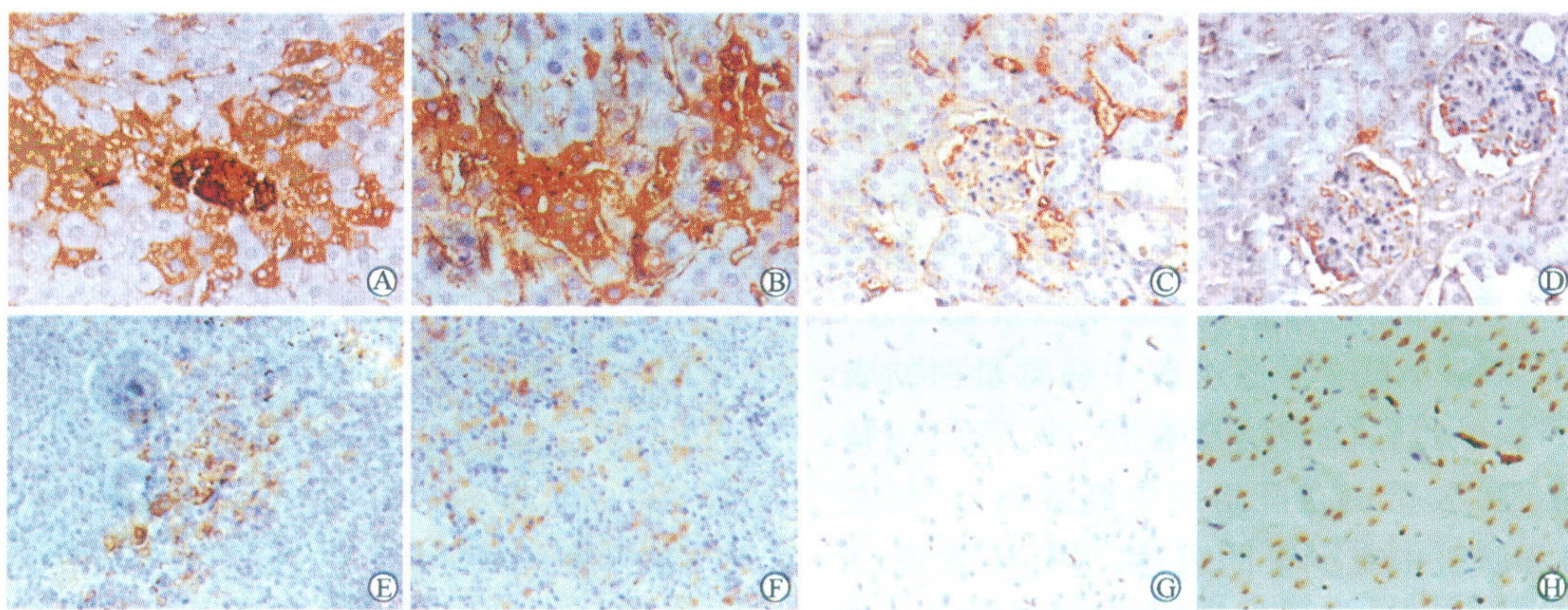


图3 HBsAg和X蛋白表达的组织特异性

Fig 3 Tissue-specific expression of HBsAg and X protein(DAB, ×200)

Expression of HBsAg was detected mainly in the liver(A), less in kidney(C) and spleen(E), and none in brain(G) of transgenic mice. Expression of X protein was detected in the liver(B), kidney(D) spleen(F) and brain(H) of transgenic mice

3 讨论

HBV转基因小鼠的重要标志之一是病毒蛋白能够表达并能分泌到血清中。理论上讲,整合于小

鼠基因组中的HBV转基因,如能进入生殖系,则其子代每一个细胞中均有目的基因,应当在每一细胞内均能检测到HBV蛋白的表达,但实际情况并非如此。目前国外已报道了4种全基因组HBV转基

因小鼠^[6~9],其中,1.3拷贝全基因组 HBV 转基因小鼠的表达最好,血清和尿液中 HBsAg 分别为 700 ng/ml 和 900 ng/ml, HBeAg 分别为 50 ng/ml 和 100 ng/ml。肝肾组织中可检测 HBsAg 和 HBcAg,但 HBsAg(+)远少于 HBcAg(卅),未检测到 HBeAg 和 HBxAg^[7]。其他 3 种小鼠血清中病毒蛋白含量很低。组织中病毒蛋白的表达比较理想的是 SCID HBV 小鼠^[9],肝组织中可检测到 3 种病毒蛋白,PC21 小鼠肝肾组织中检测不到 HBsAg,可检测到 HBcAg,但肾组织阳性细胞数(50%)大于肝组织(10%)^[6],而 1.2HB-BS 小鼠肝组织中未检测到任何病毒蛋白^[8]。本研究结果发现,F6~F17 代 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU 转基因小鼠血清中 HBsAg 和 HBeAg 的阳性率分别为 55.18% 和 25.00%,而且血清中 HBsAg 和 HBeAg 的分布不同步。从 ELISA $D_{450/630}$ 值分析其表达量发现,绝大部分转基因小鼠血清中 HBsAg 和 HBeAg 的含量较低,HBsAg 和 HBeAg 高表达者分别占 18.57% 和 9.21%。肝组织免疫组化分析显示,DNA 水平阳性的转基因小鼠中,肝组织中至少可检测到一种病毒蛋白,HBsAg、HBcAg 和 X 蛋白的检出率分别为 85.82%、58.25% 和 49.61%,其中 29.27% 的转基因小鼠同时表达 3 种病毒蛋白。这些结果表明,该品系转基因小鼠中整合的 HBV DNA 可在肝组织中表达病毒蛋白,其中部分小鼠病毒蛋白可分泌到血液中。Chisari 认为,造成不同品系 HBV 全基因组转基因小鼠病毒蛋白表达量不同的原因主要是转基因本身的结构导致的,1.3 拷贝的 HBV 转基因上游序列包括了 *x* 基因启动子区和增强子 I,下游为共同的 poly(A)信号^[7]。我们认为,HBV 转基因的表达的确与其结构有关,但只是影响因素之一。

对“3号”品系小鼠全身各组织中病毒蛋白的表达分析发现,病毒蛋白的表达具有肝、脾、肾组织特异性,HBsAg 和 X 蛋白在肝组织中高表达(40%左右),在肾脏和脾脏中有少量的表达,另外还发现,X 蛋白在脑组织中也有表达。对肝组织中 HBsAg 的表达形式分析发现,HBsAg 的表达具有细胞特异性,大多数小鼠 HBsAg 分布在汇管区或中央静脉周围,这与国外报道的非全基因组 HBV 转基因小鼠相似,全基因组小鼠中,SCID HBV 小鼠病毒蛋白的表达具有组织特异性:肝组织中优势表达,肾脏中少量表达,胰腺和心脏中有微量的 HBsAg^[9]。1.3 拷贝小鼠 HBcAg 的表达具有组织细胞特异性,中央静脉周围的肝细胞表达量很高^[7]。目前认为,

HBV 转基因小鼠中 HBV 的表达由病毒本身的调节元件和宿主因素共同决定,HBV 增强子区可能与细胞中的蛋白相互作用,调节 HBV 的表达^[11,12]。

总之,通过我们对 F6~F17 代 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系转基因小鼠血清和组织中病毒蛋白表达情况的研究表明,该品系转基因小鼠可表达乙肝病毒蛋白并能分泌到血清中,病毒蛋白的分布具有一定的组织细胞特异性,同一转基因小鼠血清中的病毒蛋白含量相对稳定但不同个体之间具有明显差异,对于造成这种个体差异的原因有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Milich DR. Transgenic technology and the study of hepatitis viruses: a review of what we have learned[J]. *Can J Gastroenterol*, 2000, 14(9): 781-787.
- [2] 胡以平,曾溢滔. 后基因组时代的基因工程小鼠[J]. 第二军医大学学报,2003;24(2): 117-119.
- [3] Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, et al. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes [J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(1): 111-114.
- [4] 曾晓渊,姚玉成,胡以平,等. 乙型肝炎转基因小鼠品系 C57-TgN(HBVadr2.0)的生物学特征[J]. 第二军医大学学报,2002, 23(11): 1179-1183.
- [5] 曾晓渊,张南,胡以平,等. HBV 转基因在 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 小鼠基因组中的整合分析[J]. 第二军医大学学报,2005, 26(3):271-274.
- [6] Farza H, Hadchouel M, Scotto J, et al. Replication and gene expression of hepatitis B virus in a transgenic mouse that contains the complete viral genome [J]. *J Virol*, 1988, 62(11): 4144-4152.
- [7] Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, et al. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice [J]. *J Virol*, 1995, 69(10): 6185-6189.
- [8] Araki K, Miyazaki J, Hino O, et al. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(1):207-211.
- [9] Larkin J, Clayton M, Sun B, et al. Hepatitis B virus transgenic mouse model of chronic liver disease [J]. *Nat Med*, 1999, 5(8):907-912.
- [10] Burk RD, DeLoia JA, elAwady MK, et al. Tissue preferential expression of the hepatitis B virus (HBV) surface antigen gene in two lines of HBV transgenic mice[J]. *J Virol*, 1988, 62(2):649-654.
- [11] Akmal M, el-Ghor A, Burk RD. DNase I hypersensitive site maps to the HBV enhancer[J]. *Virology*, 1989, 172(2):478-488.

[收稿日期] 2004-10-27

[修回日期] 2004-12-10

[本文编辑] 邓晓群