

· 论 著 ·

## C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU 小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的表达模式分析

訾晓渊<sup>1</sup>,熊俊<sup>1</sup>,张南<sup>1</sup>,张树忠<sup>1</sup>,巴月<sup>2</sup>,姚玉成<sup>1</sup>,李建秀<sup>1</sup>,王新民<sup>1</sup>,马风云<sup>1</sup>,胡以平<sup>1\*</sup>

(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)

**[摘要]** **目的:**分析 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系转基因小鼠的月龄、性别和遗传背景与其血清和肝组织中 HBsAg 表达模式的关系。**方法:**采用血清 ELISA 检测和免疫组织化学的方法检测转基因小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的表达,统计学方法分析转基因小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的表达与小鼠的月龄、性别、遗传背景的相关性。**结果:**转基因小鼠在出生后 1~3 个月时,血清中 HBsAg 的表达较低或甚至不表达,8 个月龄左右时最高,此后逐渐降低,但肝组织中 HBsAg 的表达相对稳定在较高水平,能真实反映转基因小鼠中 HBsAg 的表达。雄性小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的表达量高于雌性小鼠( $P<0.05$ )。转基因小鼠与 C57BL/6 品系、DAB 品系和 129s 品系正常小鼠交配后的子代,其血清和肝组织中 HBsAg 表达量均未发生变化。血清阳性的小鼠中肝组织 HBsAg 阳性率为 94.05%,两者呈正相关关系( $r=0.257, P<0.01$ )。**结论:**C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系转基因小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的表达具有发育调节和性别差异。

**[关键词]** 病毒,乙型肝炎;小鼠,转基因;HBsAg;血清;肝

**[中图分类号]** R 512.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0279-04

### Expression pattern of HBsAg in serum and liver tissue of C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU transgenic mice

ZI Xiao-yuan<sup>1</sup>, XIONG Jun<sup>1</sup>, ZHANG Nan<sup>1</sup>, ZHANG Shu-zhong<sup>1</sup>, BA Yue<sup>2</sup>, YAO Yu-cheng<sup>1</sup>, LI Jian-xiu<sup>1</sup>, WANG Xin-min<sup>1</sup>, MA Feng-yun<sup>1</sup>, HU Yi-ping<sup>1\*</sup> (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)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To explore the relationship between expression pattern of HBsAg in the serum and liver tissue and age, sex and genetic background of C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 transgenic mice. **Methods:** ELISA and immunohistochemistry were used to evaluate the expression level of HBsAg in serum and liver of C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 transgenic mice. The relationship between expression pattern and age, sex and genetic background was analyzed by statistical methods. **Results:** One to 3 months old transgenic mice expressed a low level or no HBsAg; expression of HBsAg reached a peak level in 8 months old mice and then declined. Expression of HBsAg in the liver was more stable than that in serum, which represented the real expression level of HBsAg in transgenic mice. Expression levels of HBsAg in serum and liver of male transgenic mice were higher than those in female mice ( $P<0.05$ ). The expression levels of HBsAg had no changes in the offsprings of different genetic background mice. There were 94.05% transgenic mice expressed both HBsAg in serum and HBsAg in liver tissue, and they had a positive correlation( $r=0.257, P<0.01$ ). **Conclusion:** Expression of HBsAg has the characteristics of developmental regulation and sexual dimorphism in serum and liver of C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU3 transgenic mice.

**[KEY WORDS]** hepatitis B virus; mice, transgenic; HBsAg; serum; liver

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 279-282]

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)转基因小鼠中,病毒蛋白的表达由转基因和宿主因素共同决定,HBV 转基因的结构、整合位点、病毒和宿主细胞中的调节元件、宿主的遗传背景等因素均有可能影响病毒蛋白的表达模式<sup>[1~5]</sup>。以往我们对 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU 品系转基因小鼠的研究发现,病毒蛋白的表达存在着个体差异,尤其是血清中的病毒蛋白其差异更加显著,这也部分限制了该品系小鼠的规模化推广应用<sup>[6]</sup>。为了详细了解影响 HBV 转基因小鼠中病毒表达的相关因素,本研究以不同月龄、性别和遗传背景的

C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系小鼠为研究对象,分析转基因小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的表达模式与上述因素的相互关系,以便明确该品系转基因小鼠的表达特点,并根据表达模式来确定其可被应用的范围。

**[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]** 訾晓渊(1976-),男(汉族),博士,讲师。

E-mail: xiaoyuanzi2001@hotmail.com

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

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 138只 C57-TgN(HBVadr2.0) SMMU“3号”品系乙肝转基因小鼠,正常 C57BL/6品系小鼠、DBA品系小鼠和 129svJ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,羊抗 HBsAg多抗购自 DAKO公司,兔抗羊 UltraSensitive™二抗试剂盒购自福州迈新公司。

1.3 血清 ELISA 酶联检测 转基因小鼠眼眶静脉丛采血 300 μl,4℃放置过夜,8 000×g离心 5 min,取血清 100 μl,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。

1.4 免疫组织化学检测 小鼠用 10 mg/ml 戊巴比妥麻醉后,剪取约 8 mm×8 mm×4 mm 大小的肝组织块,用 PBS 冲洗后,置于 10%中性甲醛中,4℃固定。按常规进行脱水、透明、石蜡包埋,制作组织切片。制片后常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,柠檬酸钠缓冲液进行微波抗原修复,采用 SP 法进行免疫组织化学检测,一抗羊抗 HBsAg 多抗按 1:500 稀释,二抗按试剂盒说明使用,DAB 显色后,充分水洗,苏木精复染、脱水、透明、封片、镜检、显微摄影记录结果,并根据 3 个以上高倍视野(HP)下阳性细胞的百分比计算阳性程度。

1.5 遗传背景分析 将不同性别的转基因小鼠分别与 DAB 品系、129 s 品系或 C57BL/6 品系小鼠交配后,血清 ELISA 和免疫组织化学方法分析其子代血清和肝组织中 HBsAg 的表达情况。

1.6 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 发育与 HBsAg 的表达 对转基因小鼠血清中 HBsAg 的含量与小鼠月龄的关系分析,结果发现,小鼠在 1~3 个月龄时血清中 HBsAg 的表达较低,甚至检测不到,此后随着小鼠的发育,血清中 HBsAg 的含量逐渐增高,至 5~8 个月龄时达到最高值,13~15 个月龄时一半以上的转基因小鼠血清 HBsAg 逐渐下降至检测不到(表 1)。

进一步分析转基因小鼠肝组织 HBsAg 的表达情况与小鼠月龄的关系,结果发现,肝组织中 HBsAg 的表达比较稳定,尤其是表达量高的小鼠,虽然

不同个体之间其表达的强度和阳性率不一致,但同一个体其肝组织中 HBsAg 的出现时间早于血清,一般在 1 个月龄时就可检测到,不同发育时期,肝组织中 HBsAg 的表达量有一定的波动,在 8~10 个月龄时达到高峰,12 个月龄时降低,此后终身维持在一定的水平,在 22 个月龄时还可检测到。这些结果表明转基因小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的表达受到发育的调节,但肝组织中 HBsAg 的表达(图 1,表 1)比血清中稳定。

表 1 不同月龄转基因小鼠 HBsAg 表达水平

Tab 1 Expression level of HBsAg in transgenic mice of different age

(n=138,  $\bar{x} \pm s$ )

Age (t/month)	Expression of HBsAg	
	Serum ( $D_{450/630}$ )	Liver (%)
1-3	0.055±0.002 1	15.163±1.741
5-8	0.137±0.010 2	20.382±1.376
13-15	0.035±0.001 4	11.249±1.405

2.2 性别与 HBsAg 的表达 同一时间点上,对该品系小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的表达率和含量与性别的分析发现,雄性小鼠和雌性小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的表达量有明显差别( $P < 0.05$ ,表 2),表明转基因小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的表达与性别有关,雄性小鼠高于雌性小鼠。

2.3 遗传背景与 HBsAg 的表达 将不同性别的转基因小鼠分别与 DAB 品系、129s 品系或 C57BL/6 品系小鼠交配后,分析其子代血清和肝组织中 HBsAg 的表达情况。结果发现,转基因小鼠与 C57BL/6 品系、DAB 品系和 129s 品系正常小鼠交配后的子代,其血清和肝组织中 HBsAg 表达量均未发生变化(表 3),统计学分析也证实来自不同亲代的转基因小鼠 HBsAg 表达量没有明显差别。表明遗传背景不影响该品系转基因小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的分布。

2.4 肝组织中 HBsAg 的表达与血清中 HBsAg 的相关性 同一时间点上,对 138 只 PCR 阳性小鼠<sup>[8]</sup>血清和肝组织中 HBsAg 的阳性情况进行比较,结果发现,血清阳性的小鼠中肝组织 HBsAg 阳性率为 94.05%(79/84),58.96%的小鼠血清和肝组织均阳性,统计学分析表明,血清和肝组织中 HBsAg 的阳性情况呈正相关( $r = 0.257, P < 0.01$ )。同时发现,在 50 只 PCR 阳性但血清 ELISA 检测阴性的小鼠中,有 36 只(72.00%)肝组织 HBsAg 阳性,这表明血清中 HBsAg 的分布与肝组织

中 HBsAg 的表达不同步,血清中 HBsAg 的分布不能真正反映转基因小鼠中病毒蛋白的表达情况。

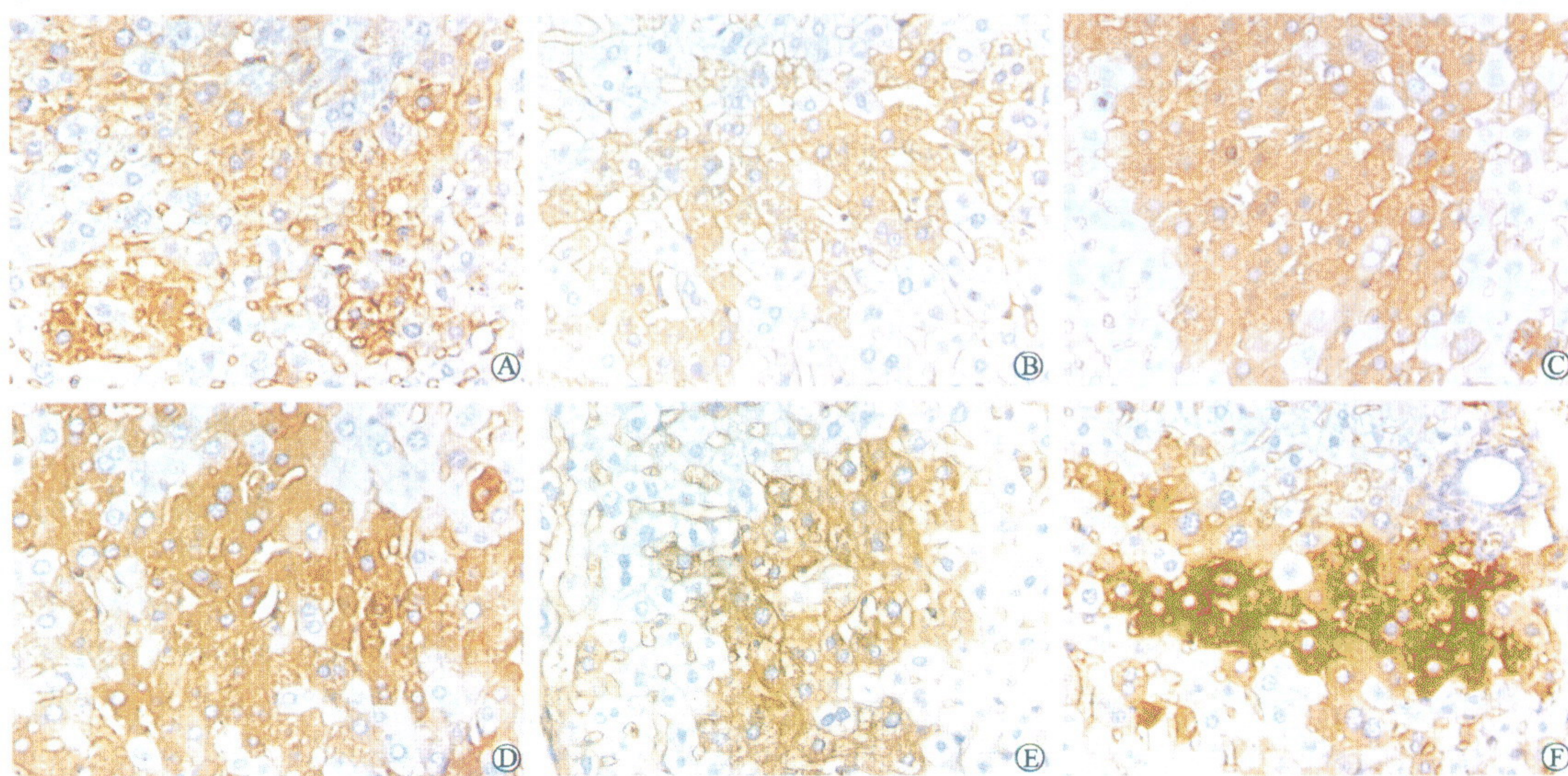


图1 转基因小鼠肝组织中 HBsAg 的表达与发育的关系

Fig 1 Correlation between development and expression of HBsAg in transgenic mice liver(DAB, ×200)

A: 2-month; B: 4-month; C: 6-month; D: 9-month; E: 12-month; F: 15-month

表2 不同性别转基因小鼠 HBsAg 表达的比较

Tab 2 Comparison of HBsAg expression between male and female transgenic mice

Sex	n	Expression of HBsAg	
		Serum ( $D_{450/630}$ )	Liver (%)
Male	75	0.146 ± 0.020	25.143 ± 2.759
Female	63	0.108 ± 0.101*	13.571 ± 2.003*

\*  $P < 0.05$  vs male transgenic mice

表3 不同遗传背景转基因小鼠 HBsAg 表达的比较

Tab 3 Comparison of HBsAg expression between different genetic background transgenic mice

Group	n	Expression of HBsAg	
		Serum ( $D_{450/630}$ )	Liver (%)
Tg+129s	19	0.091 ± 0.020	13.200 ± 1.831
Tg+C57	53	0.056 ± 0.004	14.300 ± 2.390
Tg+DBA	16	0.068 ± 0.012	11.400 ± 1.962

### 3 讨论

成功建立转基因小鼠的关键是转基因必须有理想的表达模式,目前人们对转基因小鼠的研究发现,影响转基因表达模式的主要因素有三方面,一是转基因本身的结构,包括启动子、增强子、内含子及其他一些基因表达调控序列<sup>[1]</sup>;二是转基因在小鼠基因组中的整合位置。利用显微注射法建立转基因小鼠时,转基因是随机整合在小鼠基因组中的,因此转基因的表达在一定程度上受到整合位点处宿主遗传因子的影响,导致转基因的表达异常<sup>[2,9]</sup>;三是小鼠本身的因素,包括遗传背景、性别、月龄等<sup>[4,5]</sup>。

在 HBV 转基因小鼠的研究中,人们发现,转基因小鼠的遗传背景、月龄和性别以及转基因本身的结构、病毒本身以及宿主细胞中的转录因子、反式作用因子和顺式作用因子、遗传印迹(genomic imprinting)等均与 HBV 的表达有关。本研究为了分析 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系小鼠中 HBsAg 的表达模式,对不同月龄、性别和遗传背景的转基因小鼠血清和肝组织中 HBsAg 的表达进行了研究,结果表明,HBsAg 的表达与小鼠的月龄和性别有关,小鼠在 1~3 个月龄时,血清中不表达或少量表达 HBsAg,5~8 个月龄时达到高峰,后逐渐下降。肝组织中 HBsAg 的表达较血清稳定,但也表现出先升高后降低的趋势。不论肝组织还是血清中,HBsAg 的表达总是雄性小鼠高于雌性小鼠。这与以往的研究相似,DeLoia 等<sup>[3]</sup>对 G7 和 G26 两种 HBV 转基因小鼠研究发现,血清中的 HBsAg 在出生后很快下降,成年后血清中 HBsAg 升高约 100 左右倍,HBsAg mRNA 升高约 5~10 倍,且雄性小鼠血清中 HBsAg 的含量高于雌性。这可能是由于不同月龄和性别的小鼠,其体内的激素水平不同,从而调节 HBV 的表达。Farza 等<sup>[10]</sup>也发现,青春期雄性 HBV 转基因小鼠血清中 HBsAg 的含量增加了 5~10 倍。阉割后雌性和雄性小鼠 HBsAg 基因的表达急剧下降,注射睾酮、雌二醇或糖皮质激素后 HBsAg 基因的表达随之增加。

对 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3号”品系转基因小鼠的遗传背景与 HBsAg 的表达发现,来

自不同亲代品系的子代转基因小鼠,其血清和肝组织中 HBsAg 的表达量未发生明显变化,表明遗传背景并不影响本品系转基因小鼠中 HBsAg 的表达。这与 Schweizer 等<sup>[11]</sup>的研究结果不一致,他们发现,HBV 转基因小鼠 E36 品系雌性转基因小鼠不管与任何品系的小鼠交配,均导致不可逆的转基因表达抑制。而雄性转基因小鼠与 C3H 或 SJL/J 品系小鼠交配,子代血清中 HBsAg 的含量无明显变化;与 DBA/2、129svJ 以及 FVB/N 品系小鼠交配后,第 1 代转基因小鼠血清中 HBsAg 的含量提高了 2~3 倍(雄性 8~15  $\mu\text{g/ml}$ ,雌性 1~4  $\mu\text{g/ml}$ );与 BALB/c 品系小鼠交配后,则导致后代完全不可逆的转基因表达缺失。

对肝组织中 HBsAg 的表达与血清中 HBsAg 的相关性研究发现,血清和肝组织中 HBsAg 的表达具有不同步的现象,血清中 HBsAg 的持续时间短,降低快,而肝组织中 HBsAg 的表达则相对稳定,这提示转基因小鼠中 HBsAg 的表达可能在分泌水平受到调节<sup>[11]</sup>;同时也提示我们,免疫组织化学检测肝组织中 HBsAg 的分布,既能较真实的反映转基因小鼠中病毒蛋白的表达情况,又具有直观和简便等优势,可用于评价该转基因小鼠的病毒蛋白表达水平,这为进一步利用该品系小鼠体奠定了良好的基础。

另一个与 HBV 转基因的表达密切相关的因素是甲基化,Yamamura 等<sup>[12]</sup>对 3 种 adr 亚型 HBV 转基因小鼠,即缺失 Bgl II-Bgl II 片段的单拷贝 HBV-Tg、单拷贝 HBV-Tg 和 3 拷贝 HBV-Tg 的研究发现,在缺失 Bgl II-Bgl II 片段的单拷贝 HBV-Tg 中无 RNA 产物产生,单拷贝和 3 拷贝 HBV-Tg 中 HBV RNA 主要在肝组织中,但这些小鼠中均未检测到 HBsAg 和 HBeAg,进一步发现,转基因小鼠中整合的 HBV DNA 所有的 CCGG 序列均被甲基化,这可能是导致 HBV 不表达的原因。给出生后 5 d 的 3 拷贝 HBV-Tg 注射 5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-AZ),连续注射 3 次(第 1 次 25  $\mu\text{g}$ ,以后 50  $\mu\text{g}$ )后,小鼠在 3 周龄时血清中可检测到 HBsAg(3~6 ng/ml),肝组织中 HBV DNA 甲基化减轻<sup>[13]</sup>。Pourcel 等<sup>[14]</sup>进一步研究表明,HBV 转基因甲基化水平与病毒蛋白的表达随发育变化及其组织特异性有关,转基因小鼠在发育过程中,HBV 被肝细胞特异性的基因重新激活,S 基因的转录与其特异性位点的去甲基和 DNase I 超敏感位点有关。本研究未对甲基化的问题进行探讨,我们将在以后的工作中

探讨这一问题,以便更好地了解 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU“3 号”品系转基因小鼠中病毒蛋白的表达模式,筛选理想的转基因小鼠个体。

## [参考文献]

- [1] Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, *et al.* High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice [J]. *J Virol*, 1995, 69(10): 6158-6169.
- [2] Valenza-Schaerly P, Pickard B, Walter J, *et al.* A dominant modifier of transgene methylation is mapped by QTL analysis to mouse chromosome 13[J]. *Genome Res*, 2001, 11(3): 382-388.
- [3] DeLoia JA, Burk RD, Gearhart JD. Developmental regulation of hepatitis B surface antigen expression in two lines of hepatitis B virus transgenic mice[J]. *J Virol*, 1989, 63(9): 4069-4073.
- [4] 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.
- [5] Allen ND, Norris ML, Surani MA. Epigenetic control of transgene expression and imprinting by genotype-specific modifiers[J]. *Cell*, 1990, 61(5): 853-861.
- [6] 晔晓渊,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.
- [7] 晔晓渊,巴月,胡以平,等. HBV 病毒蛋白在 C57-TgN(HBVadr2.0)SMMU 小鼠中的表达[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(3): 275-278.
- [8] 晔晓渊,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.
- [9] 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.
- [10] Farza H, Salmon AM, Hadchouel M, *et al.* Hepatitis B surface antigen gene expression is regulated by sex steroids and glucocorticoids in transgenic mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(5): 1187-1191.
- [11] Schweizer J, Valenza-Schaerly P, Goret F, *et al.* Control of expression and methylation of a hepatitis B virus transgene by strain-specific modifiers[J]. *DNA Cell Biol*, 1998, 17(5): 427-435.
- [12] Yamamura K, Tsurimoto T, Ebihara T, *et al.* Methylation of hepatitis B virus DNA and liver-specific suppression of RNA production in transgenic mouse[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1987, 78(7): 681-688.
- [13] Araki K, Miyazaki J, Tsurimoto T, *et al.* Demethylation by 5-azacytidine results in the expression of hepatitis B virus surface antigen in transgenic mice[J]. *Jpn J Cancer Res* 1989, 80(4): 295-298.
- [14] Pourcel C, Tiollais P, Farza H. Transcription of the S gene in transgenic mice is associated with hypomethylation at specific sites and with DNase I sensitivity[J]. *J Virol*, 1990, 64(2): 931-935.

[收稿日期] 2004-10-27

[修回日期] 2004-12-10

[本文编辑] 邓晓群