

# 肝脏特异性可调控丙型肝炎病毒核心蛋白表达的转基因小鼠模型的建立

杨国柱<sup>1,2</sup>, 傅思莹<sup>3</sup>, 黄冰<sup>4</sup>, 单于<sup>1</sup>, 肖东<sup>1</sup>, 马芸<sup>1</sup>, 邓新燕<sup>1</sup>, 陈系古<sup>1</sup>

(1. 中山大学药学院实验动物中心; 2. 广东药学院生命科学与生物制药学院; 3. 广州中医药大学第一临床医学院; 4. 中山大学中山眼科中心眼科学国家重点实验室, 广东 广州 510080)

**摘要:** 【目的】制备 TRE-HCV-C 转基因小鼠, 为四环素调控系统的体内研究提供了反应部分的转基因小鼠, 以便与本实验室同时建立的调控部分的小鼠共同作用, 为进一步建立双转基因小鼠模型奠定基础, 更为丙型肝炎病毒核心蛋白(HCV-C)的发病机制的研究提供一个实用方便的模型。【方法】重组构建含有目的基因 HCV-C、TRE 序列和 SV40 polyA 的转基因载体 pTRE-HCV-C, 以显微注射的方法将 1.153 kb 的转基因片段注入 BALB/C 母鼠的受精卵, 出生动物及其后代经 PCR 初步筛选出阳性, 再经 Southern 杂交对阳性鼠基因组 DNA 标本行进一步鉴定。用转基因阳性小鼠和整合有肝脏特异性启动子 ApoE 和 rtTA 基因的另一品系转基因小鼠杂交, 得到子代 F1 小鼠, 通过免疫组织化学来初步检测 HCV-C 在肝脏中特异性的可调控性的表达。【结果】产生了 5 只整合有 TRE-HCV-C 基因的首建鼠, 以及它的子代也带有此基因。与基因组上整合有肝脏特异性启动子 ApoE 和 rtTA 基因的转基因小鼠杂交后, 得到子代 F1 小鼠, 特定时间与 DOX 作用后, 小鼠肝脏的免疫组织化学结果表明, TRE-HCV-C 小鼠为丙型肝炎病毒核心蛋白的发病机制研究提供了一个良好的动物模型工具。【结论】成功制备了 HCV-C 转基因小鼠, 可利用四环素调控系统来研究 HCV 中的 C 基因对小鼠的作用, 为进一步建立四环素调控系统调控下表达 HCV-C 基因双转基因小鼠模型奠定基础, 也是 HCV-C 基因功能研究及与肝细胞癌的关系的机制研究的一个有用工具。

**关键词:** HCV-C; 丙型肝炎病毒核心蛋白; 转基因小鼠模型; 四环素调控系统; 组织特异性表达

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)04-0373-05

## Development of Transgenic Mice Specially Express HCV-C in Liver by Tet-on System

YANG Guo-zhu<sup>1,2</sup>, FU Si-ying<sup>3</sup>, HUANG Bing<sup>4</sup>, SHAN Yu<sup>1</sup>, XIAO Dong<sup>1</sup>, MA Yun<sup>1</sup>,  
DENG Xin-yan<sup>1</sup>, CHEN Xi-gu<sup>1</sup>

(1. Center of Experimental Animals, SUN Yat-sen University; 2. School of Life science and Biopharmacology, Guangdong Pharmaceutical University; 3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM; 4. Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the role of HCV core protein(HCV-C) in the pathogenesis of HCV disease by establishing TRE-HCV-C transgenic mice model mediated by Tet-On system, which will provide a powerful animal model for exploring the role of HCV-C in the etiology pathomorphology and treatment of HCV diseases. 【Methods】For overcoming the leaky of adequate HCV animal model, a transgenic construct, containing HCV-C, TRE, the CMV min promoter and the SV40 poly A, was generated, in which the HCV-C was isolated from the HCV cDNA library with PCR-screening. 1.513kb of DNA fragment was introduced into fertilized eggs by microinjection. Injected eggs were implanted into the oviducts of female mice respectively, from which offspring were obtained. The founder mice and their progeny were screened for integration of transgene into the mouse genome. Mating the two positive types of mice, identification and expression of ApoE-rtTA/TRE-HCV-C gene in their progeny were determined by PCR, Southern blot, and then after adding doxycycline (Dox) to the positive transgenic mice of two months old, HE

收稿日期: 2007-04-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(103055, 30640047); 国家九五攻关课题(101033); 广东省重点攻关课题(203078)

作者简介: 杨国柱(1979-), 女, 土家族, 中山大学药学院实验动物学硕士, 现任广东药学院生命科学与生物制药学院助教; 陈系古, 通讯作者, 教授, E-mail: xiguchen@163.com

staining, immuno-histochemistry and Western blot were performed. 【Results】 Five mice carry the HCV- C gene by the identification of PCR and Southern blotting. The transgenic F1 mice were crossed with mice whose genomic DNA is integrated by rtTA and ApoE carrying construct. The results of ICC showed that the HCV- C protein was expressed in dual transgenic mice under the reaction of rtTA protein. 【Conclusions】 A transgenic mice model inducible expressed HCV core protein is established successfully, which can be used to study the role of HCV Core protein (HCV- C) in the pathogenesis of HCV disease, and to further lay the foundation of establishing dual transgenic mice model.

Key words : HCV- C gene, hepatitis C core protein; transgenic mice model; tetracycline regulated system; tissue specific expression

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2007, 28(4):373- 377]

1992年,Gossen等<sup>[1]</sup>提出了一种可控的、高效的基因表达系统,称Tet-off基因表达系统。该系统主要由四环素调控激活因子(tetracycline-controlled transactivator, tTA)和四环素反应元件(tetracycline responsive element, TRE)组成。该系统可以使基因的表达随着四环素浓度的增加以一种剂量依赖性的方式逐渐关闭甚至为零。1995年,Gossen等<sup>[2]</sup>通过改变tTA的氨基酸顺序得到一四环素反式激活因子(reverse tetracycline-controlled transactivator, rtTA),构建了Tet-on基因表达系统。该系统在没有四环素的情况下基因表达水平为零,而在四环素或其衍生物强力霉素(doxycycline, Dox)存在时,rtTA即与TetO结合启动转录。目前越来越多的研究采用四环素调控系统,将其运用于动物模型从而实现某些基因的时空表达来研究此类基因的功能。C蛋白是丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)编码的一种重要的结构蛋白,越来越多的研究表明C蛋白与HCV感染所致肝癌的发生有密切关系<sup>[3]</sup>,但由于HCV具有极强的宿主特异性,目前对HCV及C蛋白的机制和功能的研究仅仅限于细胞模型,缺乏合适的小动物模型严重阻碍了在动物整体水平上的研究<sup>[4]</sup>。因此本研究应用四环素调控系统构建了携带TRE-HCV-C的转基因小鼠,为实现丙肝核心蛋白在肝脏的时空特异性的表达提供了一个极为有利的模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 种鼠为性成熟的BALB/C鼠,结扎公鼠为性成熟的BALB/C鼠,供卵鼠为4~6周龄BALB/C鼠。假孕鼠为8周龄BALB/C鼠(均为中山大学药学院实验动物中心提供)。

1.1.2 工具酶与试剂 质粒pHCV-MA由日本

Prof. Akio Nomoto 馈赠, pTRE 由美国阿肯色州医学研究中心范春阳博士馈赠。宿主菌 E.coli JM-109 由本实验室保存。限制性内切酶 Xho, Hind, EcoR, Xba (TaKaRa 公司), 质粒 DNA 提取试剂盒, 胶回收试剂盒, PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN 公司), Taq 酶, dNTP, T4DNA 连接酶, Milli-Q 超纯水 (Gibco 公司), 蛋白酶 K (TaKaRa 公司), M2, M16、透明质酸酶 (Sigma 公司), North<sup>2</sup> South Direct HRP Labeling and Detection Kit (PIERCE 公司)。PCR 引物 (根据 Genbank 自行设计)。孕马血清 (pregnant mare serum, PMS) 和人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 均购自天津市华孚生物制品公司。鼠源性抗 HCV- C 蛋白单抗购自 CLONTECH 公司。

### 1.2 转基因载体的构建

使用 QIAquick Plasmid Extraction Kit 提取质粒 pHCV-MA (内含目的片段 HCV- C cDNA 序列) 作为模板 (Template), 根据 2b 型 HCV 全长 cDNA 序列<sup>[5]</sup> (Genebank 登录号: AB030907) 设计上下游引物 P1 和 P2, PCR 扩增 HCV- C 基因片段, 目的片段长度为 573 bp。P1 5'-GGCGAATTCATGAG CACAAATCCTAAACC-3'; P2 5'-GCTCTAGATGA AGACTGGCACTGTAAACG-3'。上游引物包含基因的起始密码和 EcoR 酶切位点, 下游引物包含基因的终止密码和 Xba 酶切位点。

PCR 产物及质粒载体 pTRE 分别进行 EcoR 和 Xba 双酶切。酶切产物使用 QIAquick Gel Extraction 进行琼脂糖凝胶电泳回收纯化。纯化的双酶切质粒 pTRE 与 PCR 产物 (C 片段) 进行连接。按 QIAGEN 试剂盒说明进行质粒提取与回收。质粒 pTRE-HCV- C 用 Xho 和 Hind 酶切, 其片段长度为 1.513 kb。QIAGEN 胶回收试剂盒回收目的片段。

### 1.3 受精卵的显微注射

回收并纯化注射片段,按常规进行显微注射和受精卵移植<sup>[9]</sup>。

#### 1.4 转基因鼠的基因型鉴定

1.4.1 鼠尾 DNA 提取 剪切鼠龄 3 周的鼠尾 3 mm,按文献<sup>[5]</sup>制备基因组 DNA 作为模板。

1.4.2 PCR 检测 利用特异性引物扩增,产物长度为 573 bp,其引物序列同 1.2。PCR 反应条件:97 变性 7 min,进入循环(94 45 s,56 45 s,72 60 s),共 30 个循环,最后一个循环在 72 延伸 7 min。10 g/L 的琼脂糖 40 V 电泳。

1.4.3 Southern 杂交检测 取 PCR 筛选阳性鼠 DNA 10  $\mu$ g,经 37 酶切过夜,阳性对照和阴性对照分别为质粒 DNA 和正常 BALB/C 鼠 DNA 分别经 Xho 和 Hind 酶切后的产物。探针为质粒 pTRE-C 经 EcoR 和 Xba 双酶切后的片段,长为 573 bp。

1.5 RT-PCR 检测转基因小鼠体内 HCV-C 基因的 mRNA 表达

利用 rtTA 工具鼠(本实验室同期制作)来检测转基因阳性的首建鼠中 HCV-C 蛋白的表达。选用 PCR 检测和 Southern 杂交检测均为阳性的 HCV-C 转基因的首建鼠与 rtTA 鼠交配产仔。一定月龄的仔鼠经过上述检测,选取两种基因均有表达的双转基因鼠,给服 DOX 达 1 个月后,剪取小鼠的各组织(如心,肺,肾,脾,肝等),提取各组织总 RNA,并以其为模板进行 RT-PCR 扩增,引物序列同 1.2,扩增长度为 573 bp,-actin 引物序列:正义引物 5'-GATATCGCTGCGCTGGTCTG-3';反义引物 5'-CGGAACCGCTCGTTGCCAAT-3',扩增长度为 220 bp。取 5  $\mu$ L PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳。

#### 1.6 HCV-C 时空特异性表达的检测

同 1.5 选取两种基因均有表达的双转基因鼠,给服 DOX 达 1 个月后,进行肝组织的免疫化学检测<sup>[9]</sup>。活体麻醉摘取部分肝叶,将取下的肝叶一部分以 10%中性福尔马林固定,石蜡切片。免疫组织化学采用 SABC 法。抗体使用 HCV-C 单克隆抗体。将未做 HE 染色的石蜡切片作常规组织免疫化学处理。

## 2 结果

### 2.1 转基因载体 pTRE-HCV-C 的构建

根据 2b 型 HCV 全长 cDNA 序列设计上下游

引物后,PCR 扩增 HCV-C 基因片段,通过电泳检测后结果表明:扩增得到目的片段 HCV-C,大小一致(图 1)。质粒 pTRE-HCV-C 用 Xho 和 Hind 酶切,其片段长度为 1.513 kb,酶切前后电泳结果表明转基因载体 pTRE-HCV-C 构建成功(图 2,3)。

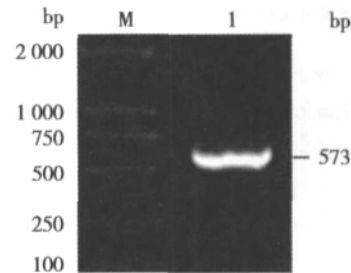


图 1 HCV-C 基因的 PCR 扩增

Fig.1 Amplification of HCV-C gene

M: DNA marker(DL2000); lane 1: HCV-C gene

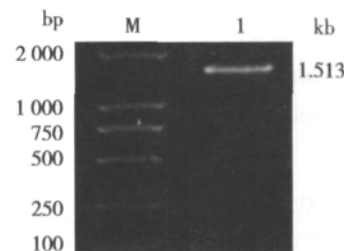


图 2 用于注射的目的 DNA 片段

Fig.2 Isolation of HCV-C fragment for injection

M: DNA marker(DL2000); lane 1: HCV-C gene

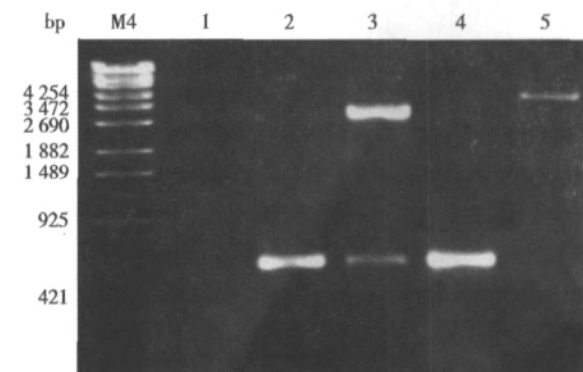


图 3 酶切和 PCR 鉴定重组质粒 pTRE-HCV-C

Fig.3 Identification of the resulting plasmid pTRE-HCV-C by enzyme digestion & PCR

M4:  $\lambda$ -EcoT14 I digest Marker (TaKaRa); Lane 1: vector pApoE for ligation; Lane 2: insert HCV-C for ligation; Lane 3: pTRE-HCV-C cut by EcoR I and BamH I; Lane 4: PCR identification using primer for HCV-C; Lane 5: pTRE-HCV-C digested by EcoR I

### 2.2 转基因小鼠的建立

应用 PCR 进行初步筛选移植受精卵后产生的仔

鼠,发现有 5 只为 TRE- HCV- C 转基因首建鼠(图 4)。Southern Blot 分子杂交分析结果表明,5 只 PCR 阳性鼠的基因组 DNA 均有 TRE- C 基因片段的整合(图 5)。

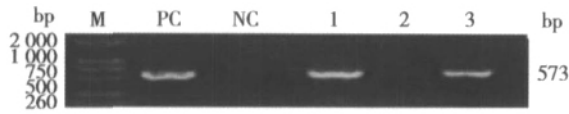


图 4 PCR 鉴定 TRE- HCV- C 转基因首建鼠的电泳结果  
Fig.4 Identification of TRE- HCV- C transgenic founder mice by PCR

M: marker2000; PC: positive control; NC: negative control; lane 1,3: positive rtTA mice

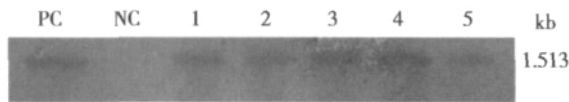


图 5 PCR 阳性 HCV- C 转基因小鼠的 Southern- blot 分析  
Fig.5 Identification of TRE- HCV- C transgenic founder mice by southern blotting

PC: positive control; NC: negative control; lane 1- 5:positive HCV- C mice

### 2.3 HCV- C 转基因小鼠的 HCV- C mRNA 组织特异性表达

RT- PCR 结果表明,转基因小鼠的目的基因

HCV- C 在体内存在有组织表达的特异性(图 6)。

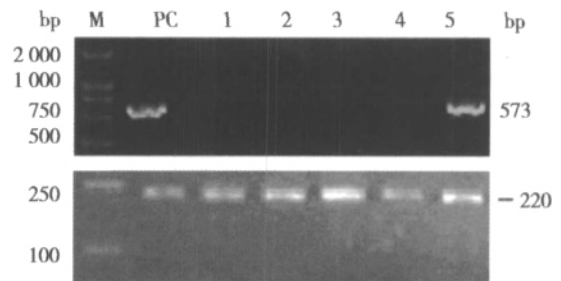


图 6 F1 代小鼠体内 HCV- C 的特异性 mRNA 表达  
Fig.6 RT- PCR of double transgenic mice

A: HCV- C mRNA in tissues of transgenic mice; B:  $\beta$ -actin mRNA in tissues of transgenic mice; M: marker 2000; pc: positive control; lane 1- 5: kidney; heart; lung; spleen; liver

### 2.4 HCV- C 转基因小鼠时空特异性表达 HCV- C 蛋白

免疫组织化学结果表明: 喂饲 DOX 后的转基因小鼠的肝细胞胞质中存在 HCV- C 蛋白的表达(图 7)。

## 3 讨论

对于丙型肝炎病毒 HCV 致病机制的研究是目前的热点之一,而 C 蛋白是 HCV 编码的一种重要的结构蛋白,被认为在 HCV 感染的慢性化发展

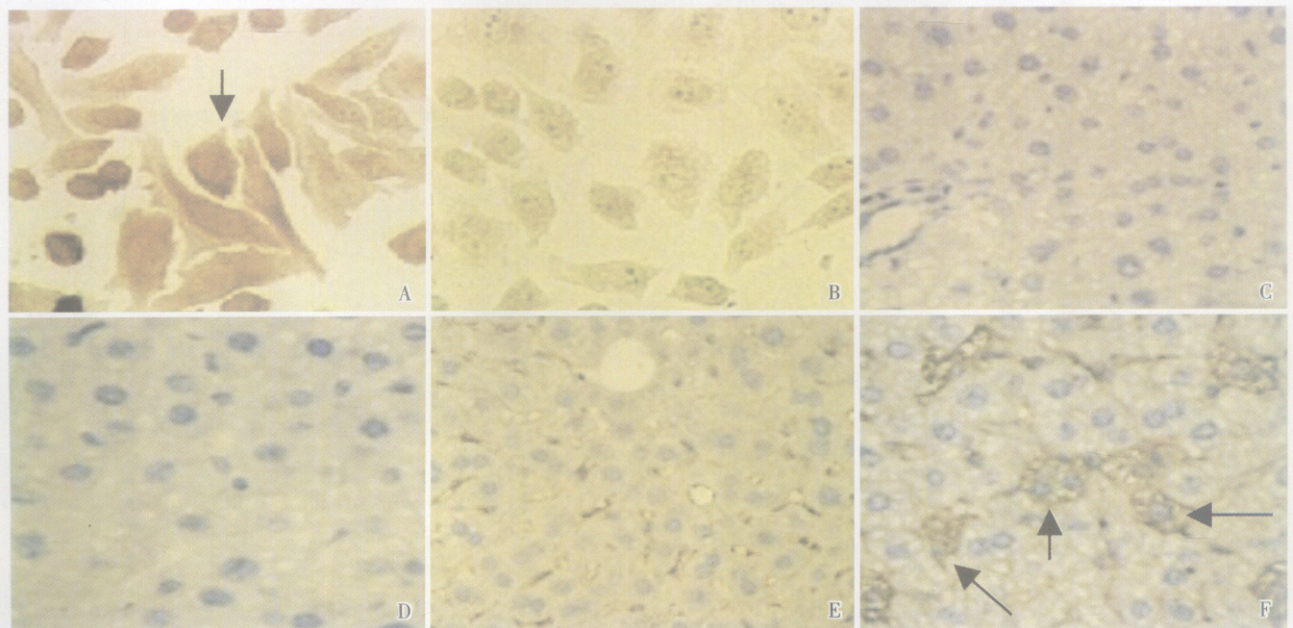


图 7 F1 代小鼠肝脏组织内 HCV- C 的免疫组化分析

Fig.7 Identification of HCV- C transgenic F1 mice about HCV- C expressing by immunohistochemistry

A: Distribution of Hepatitis C virus core protein (HCV- C) in the Chang- liver cells transfected with the HCV- C gene as positive control; B: untransfected Chang- liver cells; C: normal BALB/C mice as controls; D: normal BALB/C mice adding Dox; E: double transgenic mice adding Dox; F: double transgenic mice not adding Dox; IHC,  $\times 200$

过程中以及 HCV 感染所致肝细胞癌的发生过程中扮演着十分重要的角色<sup>[3]</sup>,蛋白与 HBV 的 X 蛋白诸多类似,是抗病毒治疗研究的重要靶位点,有助于探讨 HCV 的致病机制及其防治。

然而,HCV 感染的宿主特异性决定了合适的动物模型的缺乏,严重阻碍了在动物整体水平上对 HCV-C 致病机制的研究。如果 HCV-C 小鼠在胚胎期表达,就会对病毒抗原会形成免疫耐受,使得在小鼠体内不一定产生病理改变。那么我们就需要利用一个条件诱导基因表达的系统。四环素调控系统是目前最为广泛使用的条件性的基因调控系统。它具有以下的优点:基础表达水平低和诱导表达水平高;目的基因表达能够人为地控制,调节特异性高,宿主基因不受影响,无相关毒性;在特定时间内调节范围较宽。

与我实验室同期构建的带有四环素调控系统调控元件 rtTA 的转基因小鼠相呼应,本实验构建了带有四环素调控系统反应元件 TRE 的 HCV 转基因小鼠,用显微注射方法将目的基因注入小鼠受精卵,出生动物及其后代经 PCR 筛选和 southern 杂交鉴定,成功地制备了整合有 TRE-HCV-C 的转基因首鼠以及它们的子代,且证实了 TRE-HCV-C 基因可以传代。在这个基础上,我们补充了国际上关于四环素小鼠资源库上的反应部分小鼠类别的一项空白,首次利用四环素反应元件 TRE 带上疾病相关蛋白 HCV-C 进行转基因小鼠的制作研究。

理论上,四环素调控系统介导的时空表达 HCV-C 转基因小鼠在正常情况下应该不能表达 HCV-C 蛋白,即目的基因处于沉默状态,而与表达 ApoE-rtTA 基因的四环素调控部分的转基因小鼠交配后获得同时带有两种外源基因的双转基因动物,在食物或饮水中加入 DOX,小鼠就能在特定的时间内在肝脏特异性的表达 HCV-C,这样就能理想地克服胚胎时期的免疫耐受以及针对肝炎病毒抗原的免疫逃避,使得表达 HCV-C 的小鼠更为接近病毒感染时的体内自然状态。而我们的实验也恰恰验证了这一点,实验小鼠仅仅在特定的条件下,特定的组织中才有 HCV-C 蛋白的表达,成功地阐明 HCV-C 蛋白的致病机制及 C 蛋白与肝细胞癌发生关系提供了较细胞模型更为理想的实验动物体系,同时更为建立四环素调控系统调控下的表达 HCV-C 的双转基因小鼠的模型奠定

了基础。从结果我们分析出,四环素调控系统的研究,在未来的基因治疗有着广阔的应用前景,尤其是对建立一个确切的疾病模型,从而作为研究疾病的机制以及靶向性药物作用的靶位有着不可忽视的作用<sup>[7]</sup>。至于 C 蛋白的表达是否会引起 HCV 感染的慢性化发展过程以及 HCV 感染所致的肝细胞癌的发生,还需要大量的数据和长期的观察,这与 ISHIKAWA T 等的看法取得了一致<sup>[8]</sup>。与此同时,我实验室还构建了携带有 tTS 的载体 rtTA,目前已经发现可以用此载体下调细胞模型上的目的基因的基础表达,动物模型研究正在进行中<sup>[9]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] GOSSEN M, BUJARD H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992,89 (11):5547-5551.
- [2] GOSSEN M, FREUNDLIEB S, BENDER G, et al. Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells [J]. Science, 1995, 268 (6):1766-1769.
- [3] SHAN Y U, CHEN XI-G U, HUANG BING, et al. Malignant transformation of the cultured human hepatocytes induced by hepatitis C virus core protein [J]. Liver International, 2005, 25 (5): 141-147.
- [4] KAWAMURA T, FURUSAKA A, KOZIEL M J, et al. Transgenic expression of hepatitis C virus structural proteins in the mouse [J]. Hepatology, 1997, 25(4): 1014-1021.
- [5] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京:高等教育出版社,1993:315-318.
- [6] ZHOU Z, TAO Z, LEE C G, et al. Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling [J]. Cell & Developmental Biology, 2002,13 (3):121-128.
- [7] GOVERDHANA S, PUNTEL M, XIONG W, et al. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges [J]. Mol Ther, 2005,12(2):189-211.
- [8] ISHIKAWA T, SHIBUYA K, YASUI K, et al. Expression of hepatitis C virus core protein associated with malignant lymphoma in transgenic mice [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis,2003,26 (6):115-124.
- [9] 张若霜,帅丽芳,赵勇,等. tts/rtta 系统下调目的基因基础表达的细胞模型研究 [J]. 中山大学学报:医学科学版,2006,27(4):361-364.

(编辑 徐杰)