

## 庚型肝炎病毒转基因小鼠的建立\*

R373.21  
R512.603胡卫江<sup>1</sup>, 戚中田<sup>1\*\*</sup>, 胡以平<sup>2</sup>, 朱分禄<sup>1</sup>, 李建秀<sup>2</sup>, 陈景山<sup>1</sup><sup>1</sup>(第二军医大学微生物学教研室, 上海 200433)<sup>2</sup>(第二军医大学细胞生物学教研室, 上海 200433)

**摘要:**利用受精卵原核显微注射的方法, 产生了含有 HGV 结构蛋白 C、E1、E2 及部分非结构蛋白 NS2、NS3 的转基因小鼠。得到 10 只 founder 小鼠, 其中有 3 只 founder 小鼠与正常小鼠交配后得到了整合有外源基因的 F<sub>1</sub> 代阳性小鼠。RT-PCR 的结果显示, 外源基因可在 founder 小鼠及 F<sub>1</sub> 代小鼠的血液有核细胞及肝细胞内转录; 组织病理学检查显示, 某些转基因小鼠的肝细胞出现了水样变、脂肪变性及轻微炎性反应等病理学改变, 但与同一品系的正常小鼠相比, 转基因小鼠血清转氨酶无明显升高。

**关键词:** 庚型肝炎病毒; 转基因小鼠; 致病性

中图分类号: R332, R512.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2000)02-0122-05

1995~1996年, 美国科学家采用分子病毒学技术, 先后分离到两株肝炎相关病毒, 分别称为 GB 病毒 C 型 (GBV-C) 和庚型肝炎病毒 (HGV)<sup>[1-3]</sup>, 两者的同源性很高, 被认为是黄病毒科的一个新种, GBV-C/HGV 是该病毒的两个不同分离株。HGV 是单股正链 RNA 病毒, 病毒基因全长约 9.4 kb, 含有单个开放读码框架。编码约 2 900 个氨基酸的病毒多蛋白前体, 该前体经加工后形成 E1、E2、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B 等病毒蛋白。1996 年《Science》杂志上发表的论文认为这种病毒可能与输血后肝炎及其他急慢性肝炎有关<sup>[3]</sup>。然而随后的研究报道就对 HGV 的致病性产生了疑问, 并提出了 HGV 是否是肝炎病毒的问题<sup>[4-6]</sup>。为进一步研究 HGV 的致病性, 我们构建了含有 HGV 基因的全部结构蛋白和部分非结构蛋白的转基因小鼠, 现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用小鼠购自上海市计划生育研究所, 供体小鼠品系为 C57, 受体小鼠品系为 Balb/c; 限制性内切酶购自 GIBCO BRL 公司, 实验用质粒 p3.1 HGV-NS3 由本实验室构建; PCR 及 RT-PCR 试剂购自 SANGO 公司; DNA 抽提试剂为常规试剂; RNA 抽提试剂 TRIzol 购自 GIBCO 公司; 凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程

收稿日期: 1999-02-08, 修回日期: 1999-05-24

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39825116, 39770393, 39830330); 上海市科技发展基金资助项目 (98JC14023)。  
作者简介: 胡卫江 (1967 年-), 女, 河北张家口市人, 博士, 讲师。主要从事乙型肝炎、庚型肝炎病毒转基因动物实验体系的研究。

\*\* 通讯作者: 戚中田 (1953 年-), 男, 河南省人, 博士, 教授。主要从事丙肝、戊肝、庚肝病毒分子生物学基因疫苗的研究。

公司;引物根据 PC-GENE 软件自行设计,上游引物位于 NS3 区 3 660~3 678 位,下游引物位于 NS3 区 4 400~4 422 位,由中国科学院上海植物生理所合成。病理学制片所用试剂为常规试剂。

## 1.2 方法

1.2.1 目的基因片段的获得 将质粒 p3.1 HGV-NS3 鉴定后,用限制性内切酶 Sal I 和 Xmn I 酶切,得到了大小不同的五个片段,分别为 34 bp 及 0.3、1.5、1.9、5.6 kb。其中 5.6 kb 条带为目的基因片段,将酶切后的 DNA 进行电泳分析,待五条带完全分开后,用凝胶回收试剂盒回收 5.6 kb 目的基因片段,溶于显微注射用 TE buffer (pH 8.0),备用(图 1)。

1.2.2 显微注射产生转基因小鼠 依常规方法进行显微注射<sup>[8]</sup>。在供体鼠和受体假孕鼠准备好后,处死供体母鼠后取出受精卵,在显微注射仪下将目的基因片段注射至 C57 供体小鼠受精卵的雄原核中,随后将显微注射操作过的受精卵移至假孕的 Balb/c 母鼠输卵管内,待其产仔。

1.2.3 HGV 转基因小鼠外源基因的复制和转录 小鼠出生二周后,抽取尾组织基因组 DNA 进行 PCR 鉴定,PCR 反应条件为:94 ℃ 3 min; 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min; 72 ℃ 1 min 10 s; 32 个循环。将 PCR 鉴定为阳性的转基因小鼠与同一品系的正常小鼠交配,以产生子代小鼠。然后取 PCR 反应为阳性的部分 F<sub>0</sub> 及 F<sub>1</sub> 代转基因小鼠的肝、肾组织及血细胞,用 TRIzol 试剂抽提各个组织的 RNA,进行反转录 PCR 反应。反转录反应的条件为:42 ℃ 30 min; 随后将反转录产物作为 PCR 反应的底物进行 PCR 反应。反应条件与上相同。

1.2.4 转基因小鼠的病理学研究 于鼠龄 6 个月时,将转基因小鼠各个组织取材,固定于 15% 的福尔马林固定液中,进行常规 H.E 染色的病理学切片分析。

## 2 结果

### 2.1 转基因小鼠的产生

共注射 233 只受精卵,注射后存活的受精卵 150 只,存活率为 74.3%;对 9 只假孕母鼠进行单侧输卵管移植,其中 6 只怀孕,怀孕率为 67.1%;共产生 28 只子鼠,存活 25 只,存活率为 89.3%;对所得到的 25 只小鼠尾组织基因组 DNA 进行 PCR 扩增。其中有 10 只小鼠的 PCR 结果出现 760 bp 左右的特异型条带,即得到了 10 只 founder 小鼠,外源基因整合率为 40%。

### 2.2 外源基因的复制

将 F<sub>0</sub> 代的阳性小鼠与同一品系的正常小鼠交配后,其中 3 只 F<sub>0</sub> 代的阳性小鼠得到了 F<sub>1</sub> 代的阳性小鼠, F<sub>1</sub> 代小鼠阳性率为 45%,另有两只 F<sub>0</sub> 代的阳性小鼠不孕(图 2)。

### 2.3 外源基因的转录

RT-PCR 的结果显示(图 3),外源基因可以在肝细胞和单核细胞内转录,并在 760 bp 处出现特异性条带。肾组织内则未见阳性条带。

### 2.4 病理学改变

所取 6 只转基因小鼠样本,包括肝、肾、心脏、皮肤、脾等多种组织,其中一只小鼠出现脂肪变性,二只小鼠出现较严重的水样变,其中一只有小灶性的淋巴细胞浸润等轻型炎症反应。其它转基因小鼠表现无特殊异常(图 4)。

## 3 讨论

### 3.1 庚型肝炎病毒的嗜肝性分析

目前,有的研究认为 HGV 可能不是嗜肝病毒,而仅仅是一种肝脏过客性病毒。本实验的 RT-PCR 及组织病理学研究的初步结果说明, HGV 基因的转录可能存在着一定的组织特异性,因为 RT-PCR 的阳性特异带主要出现在肝细胞和血液有核细胞中,肾脏中未见明显的阳

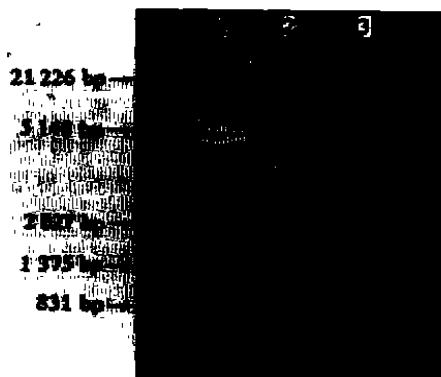


图 1 显微注射用目的片段  
Fig. 1 The target fragment for microinjection  
1,  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III;  
2, p3.1 HGVS3/Sal I + Xmn I



图 2 琼脂糖电泳检测部分转基因小鼠尾组织 DNA 的 PCR 扩增产物  
Fig. 2 The electrophoresis of tail tissue DNA PCR product in agarose gel  
1,  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III; 2, positive control;  
3, negative control; 4-8, HGVS transgenic mice

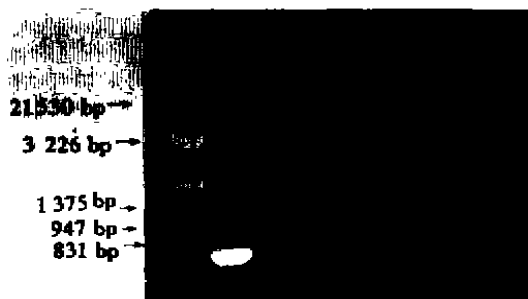


图 3 琼脂糖电泳检测部分转基因小鼠血液单核细胞 RT-PCR 扩增产物  
Fig. 3 The electrophoresis of blood cell RNA RT-PCR product in agarose gel  
1,  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III; 2, positive control; 3, negative control; 4-8, HGVS transgenic mice

性条带。明显的病理学改变也仅发生在肝细胞,其他组织无特殊异常。目前正在利用 HGVS 完整基因组克隆<sup>[7]</sup>,构建含有 HGVS 全基因组的转基因小鼠,以进一步研究 HGVS 的组织细胞亲嗜性及 HGVS 的其他特性。

### 3.2 HGVS 基因的整合位点与病理改变的关系

一般情况下,外源基因在转基因小鼠体内的整合位点是随机的,在本实验中,病理改变较严重的 2 只转基因小鼠,来自同一个 founder 小鼠及其后代。因此 HGVS 在转基因小鼠体内的致病性是否与 HGVS 基因的插入位点有关值得进一步的研究。

HGVS 转基因小鼠的工作还是刚刚开始,此体系的建立对 HGVS 的复制、转录、嗜肝性及致病性的研究将有重要的意义。

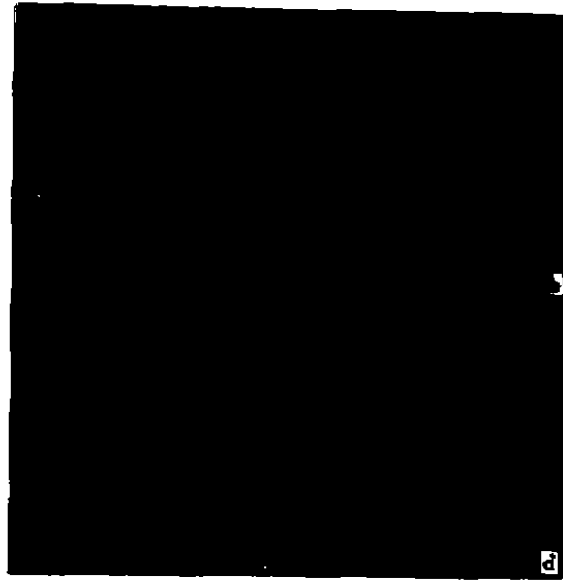


图 4 转基因小鼠体内的病理学改变

- a, 正常小鼠肝细胞; b, 转基因小鼠肝细胞的脂肪变性; c, 转基因小鼠肝细胞的水样变;  
d, 转基因小鼠肝细胞的肝小叶区的小灶性淋巴细胞浸润

Fig. 4 Histopathological findings in HGV transgenic mouse liver

- a, age-matched negative littermate; b, steatosis in hepatocytes in transgenic mouse;  
c, hydropic change in hepatocytes; d, lymphocyte filtration in hepatocytes of transgenic mouse

### 参 考 文 献

- [1] 金冬雁. 庚型肝炎病毒是肝炎病毒吗[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1997, 11(4): 301~305
- [2] Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis [J]. J Med Virol, 1996, 48(1): 60~67
- [3] Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent [J]. Science, 1996, 271(5248): 505~508
- [4] Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis G virus - a true hepatitis virus or an accidental tourist [J]. NEJM, 1997, 336(11): 795~796
- [5] Theodore D, Lemon S M. GB virus C, hepatitis G virus, or human orphan flavivirus [J]. Hepatology, 1997, 25(5): 1285~1286
- [6] Haydon GH, Jarvis LM, Simpson KJ. The clinical significance of the detection of hepatitis GBV-C RNA in the serum of patients with fulminant, presumed viral, hepatitis [J]. J Viral Hepat, 1997, 4(1): 45~49
- [7] 朱分祿, 戚中田, 等. 庚型肝炎病毒基因组全长 DNA 的拼接与克隆[J]. 第二军医大学学报, 1998, 19(4): 301~306
- [8] 胡以平, 秦世真, 等. 嵌合基因 8KpF 在转基因小鼠内的组织特异性表达[J]. 遗传学报, 1992, 19(1): 27

## Establishment of Transgenic Mouse Model Carrying HGV Genes

HU Wei-jiang<sup>1</sup>, QI Zhong-tian<sup>1</sup>, HU Yi-ping<sup>2</sup>, ZHU Fen-lu<sup>1</sup>,  
LI Jian-xiu<sup>2</sup>, CHEN Jing-shan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(*Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*)

<sup>2</sup>(*Department of Cell Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*)

**Abstract:** The target fragment of HGV genes including C, E1, E2, NS2 and partial NS3 regions was microinjected into the pronuclei of mouse fertilized eggs according to the standard methods. Ten mice containing the HGV genes were identified by the screening of polymerase chain reaction with the primers in NS3 region. The integrated HGV genes were vertically transmitted to the offspring, and the F<sub>1</sub> heterozygous mice from three founders were detected positive. The results of RT-PCR indicated that the HGV genes can be transcribed in blood monocytes and hepatocytes. The conventional pathological observation suggested that the transgenic mice had the cloudy swelling, steatosis, hydropic change and inflammatory cellular infiltration. However, serum ATL level showed no significant difference between transgenic and normal mice.

**Key words:** Hepatitis G virus; Transgenic mouse; Pathogenicity