

Replication and Expression of Sperm-mediated HBV DNA in Early Mouse Embryo

精子携带的 HBV DNA 在小鼠早期胚胎中的复制与表达

XIONG Xiao-fang, HUANG Tian-hua*, XIE Qing-dong,
WANG Xiao-mei, CHEN Gui-lan
(Research Center for Reproductive Medicine,
Shantou University Medical
College, Shantou 515041, Guangdong, China)

熊小芳/ 黄天华*/ 谢庆东/
王晓梅/ 陈桂兰
(汕头大学医学院生殖医学研究中心,
广东 汕头 515041)

【摘要】背景与目的: 研究乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV) DNA 在早期胚胎中能否复制与表达, 探讨 HBV 经雄性生殖细胞垂直传递的可能性。材料与方法: 成熟雄鼠麻醉后双侧睾丸注射经脂质体 DOSPER 包裹的 HBV 质粒, 手术后雄鼠与超排雌鼠合笼交配, 用荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH) 分别检测单细胞胚和二细胞胚间期核中 HBV DNA 的存在与复制, 用逆转录聚合酶链反应(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 和免疫荧光方法检测 HBV 基因在二细胞胚胎中的表达。结果: 在单细胞胚和二细胞胚间期核内发现 HBV DNA 阳性杂交信号, RT-PCR 可以扩增出 HBx 基因的特异条带, 免疫荧光也可见到 HBsAg 阳性信号。结论: HBV DNA 进入雄性生殖细胞后, 可以整合到宿主基因组内, 通过自然受精随精子进入卵母细胞, 并在早期胚胎中复制与表达。提示 HBV 有可能通过雄性生殖细胞进行垂直传递。

【关键词】乙型肝炎病毒 DNA; 复制与表达; 早期胚胎; 垂直传递

中图分类号: Q345.21; R512.62

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)03-0175-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To explore the feasibility of hepatitis B virus (HBV) vertical transmission via male germ line, the replication and expression of sperm-mediated HBV DNA in mouse embryo were studied. MATERIAL AND METHODS: Young adult male mice were injected with HBV DNA-liposome complex. These males were serially mated with superovulated females 2 days after injection. Fluorescence in situ hybridization (FISH) was carried out to confirm the integration of HBV DNA into male pronucleus and its replication with cell division in embryonic development. (Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) and immunofluorescence assay were performed to observe the expression of the HBV gene in two-cell stage. RESULTS: FISH demonstrated that the male pronuclei in some one-cell embryos and the each nucleus in some two-cell embryos presented positive signals. RT-PCR showed the specific bands of cDNA of HBx DNA in some two-cell embryos. Immunofluorescence assay presented the positive signals for HBsAg in some two-cell embryos. CONCLUSION: Our results provided the direct evidence for that HBV DNA are able to transmit vertically to next generation via male germ line.

【KEY WORDS】hepatitis B virus DNA; replication and expression; early embryo; vertical transmission

真正意义上的垂直传播 (True vertical transmission) 是指患者的生殖细胞受病毒感染, 在受精时由精子或卵细胞作为载体, 将病毒基因带到胚胎进而使子代患病的一种新的、尚待证实的传播方式^[1]。近二十年来有关乙

型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 是否可能经精子垂直传播成为这一领域的研究热点: 1985 年 Hadchouel 等^[2]检查 17 例 HBV 感染者的精液, 从 3 份急性肝炎患者精液中查到 HBV DNA, 其中 2 份为整合状态, 所以首

收稿日期: 2004-11-30; 修订日期: 2004-12-28

基金项目: 国家自然科学基金资助(No. 39970374)

作者简介: 熊小芳(1978-), 女, 湖北省赤壁市人, 硕士研究生, 研究方向: 生殖遗传学。

* Correspondence to: HUANG Tian-hua Tel: 86-754-8900845, E-mail: thuang@stu.edu.cn

先提出了 HBV 可能经生殖细胞垂直传播的假设。不久, Davison 等^[3]从 HBsAg 慢性携带者精细胞中检查出了分子量为 3.2 kb 的 HBV DNA, 再次提示了 HBV 经生殖细胞传播的可能性。随后, 国内学者朗振为等^[4]研究发现 HBV DNA 分布于睾丸内各级生精细胞核中, 认为 HBV DNA 可能以整合状态的形式存在于人精子基因组中。1999 年, 王珊珊等^[5]从配偶无任何 HBV 感染标志而男性是 HBV 携带者的流产胎儿检测出 HBV DNA, 并测序分析了父亲精子 HBV DNA 与胎儿血清中 HBV DNA 序列, 发现父儿间核苷酸同源率为 98%~100%, 为 HBV 父儿垂直传播的可能性提供了分子水平的证据。这些研究为进一步探讨 HBV 经精子种系传播奠定了理论和实验基础。

然而, 由于伦理道德等原因不能进行人体试验, 更深入探讨 HBV 感染精子以及感染后精子对早期胚胎甚至子代影响的相关报道较少。因此, 我们研究利用脂质体包裹 HBV 质粒 DNA 后, 打点式注射到小鼠双侧睾丸, 手术后雄鼠与激素超排雌鼠合笼^[6-7], 收获单细胞期或二细胞期胚胎, 对早期胚胎进行了 HBV DNA 的存在以及基因复制与表达方面的检测, 以期为 HBV 真正意义上的父婴垂直传播途径提供直接证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 昆明种小鼠, 雌鼠 4~5 周龄, 雄鼠 8~10 周龄, 购自第一军医大学实验动物中心。

1.2 外源基因 质粒 pBR322-HBV DNA 由第二军医大学细胞生物学教研室胡以平教授惠赠。

1.3 主要试剂 孕马血清促性腺激素 (Gonadotropin from pregnant mare serum, PMSG) 与人绒毛膜促性腺激素 (human Chorionic Gonadotropin, hCG) 购自宁波激素制品有限公司。脂质体 DOSPER 购自德国 Roche 公司, 荧光原位杂交试剂盒: Avidin-FITC, Biotinylated Anti-Avidin 购自美国 Vector 公司; 荧光原位杂交探针标记试剂盒购自美国 GIBCO BRL, Cells-to-cDNA RT-PCR 试剂盒购自美国 Ambion 公司, 即用型免疫荧光试剂盒购自武汉 Boster 公司, 一抗: 小鼠抗人 HBsAg 购自福建迈新公司。

1.4 方法

1.4.1 注射用质粒的制备 将 pBR322-HBV 转化入空白感受态菌种 DH5 α , 铺板并用氨苄青霉素筛选后, 挑取阳性克隆, 大量培养, 抽提纯化质粒^[8], 稀释至浓度 700 μ g/ml, 置 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.4.2 质粒 pBR322-HBV 转染液的配制 无菌条件下, 取 pBR322-HBV 质粒 DNA 1.5 μ g, 加入 HBS

(Hepes-buffered saline, 20 mmol/L Hepes, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 缓冲液至 50 μ L 配制成 A 液, 再取 6 μ L 脂质体 DOSPER 加入 44 μ L HBS 缓冲液至 50 μ L 配制成 B 液, 按 1:1 混合 A 液和 B 液, 置于 20 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 以形成脂质体-DNA 复合物, 然后在包裹好的质粒溶液中加入 Trypan Blue (Sigma) 染料至终浓度为 0.05%。

1.4.3 pBR322-HBV DNA 质粒导入睾丸组织

挑选健康性成熟雄鼠, 用 0.2% 戊巴比妥麻醉, 酒精棉球消毒阴囊部, 用注射器将转染液成打点式注射到双侧睾丸中, 每侧注射 25 μ L, 可见进针部位附近迅速变成蓝色。同时设置阴性对照组, 睾丸只注射生理盐水。

1.4.4 胚胎细胞的采集

雌性小鼠动情周期第 1 d, 腹腔注射 PMSG 15 IU, 48 h 后, 腹腔注射 hCG 15 IU, 与手术后雄鼠同笼过夜。次日晨 8:00 检查, 有阴道栓者为受孕, 分别于注射 hCG 后 18~20 h 或 38~40 h, 用颈部脱臼法处死小鼠, 取出输卵管, 用显微吸管收集单细胞胚或二细胞期胚胎。

1.4.5 荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 胚胎细胞制片及 FISH 步骤见有关文献^[9,10]。

1.4.6 逆转录聚合酶链反应 (Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

提取 RNA 和反转录的实验步骤按照 Cells-to-cDNA 试剂盒说明书中的两步法进行, 用反转录所得的 cDNA 作为模板扩增 HBV 基因, 引物由 TaKaRa 公司合成, 上游引物: 5'-GAAGCTCTAGCAGCTTGT-3', 下游引物: 5'-TGAACAGTAGGACATGA ACA-3', PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 35 s, 60 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用 1.2% 琼脂糖在凝胶电泳基础上用溴化乙啶 (Ethidium bromide, EB) 染色进行分析, 扩增产物预期大小为 591 bp, 该片段含有 HBV 基因组的 X 区。

1.4.7 免疫荧光检测 收集二细胞胚, 用新鲜配制的胰酶 (pH 2.5) 去除透明带, 在磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution, PBS) (pH 7.4) 中洗涤 3 次, 经 2% 多聚甲醛 (含 0.5% Triton X-100, 0.5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L 乙二醇双氨基乙基四乙酸, 50 μ mol/L 甘氨酸) 室温处理 30 min, 10% 血清封闭后加入 50 μ L 小鼠抗人 HBsAg 抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加 50 μ L 兔抗鼠 IgG (二抗), 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 再加入异硫氰酸盐 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的生物素化的三抗, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, PBS 洗 4 次, 每次 5 min, 碘化丙啶 (Propidium

iodide,PI)复染 10 min, 封片, OLYMPUS 荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 单细胞胚 FISH 结果

对含有雌、雄原核的单细胞胚进行 FISH, 可见雄原核上有 HBV DNA 阳性杂交信号 (图 1)。

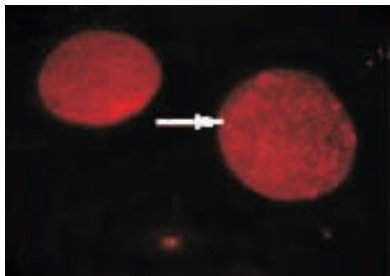


图 1 FISH 结果。单细胞胚中的雌、雄性原核, 雄原核内可见 HBV DNA 阳性杂交信号(箭头所示, 1 000×)

Figure 1 FISH results. Showing positive signal of HBV DNA integrated into the male pronucleus in one-cell embryo (arrow, 1 000×)

2.2 二细胞胚 FISH 结果

对二细胞胚进行 FISH, 可见每个细胞的间期核上有 HBV DNA 阳性杂交信号, 在所有作为阴性对照的间期核中未见 HBV DNA 阳性杂交信号 (图 2)。

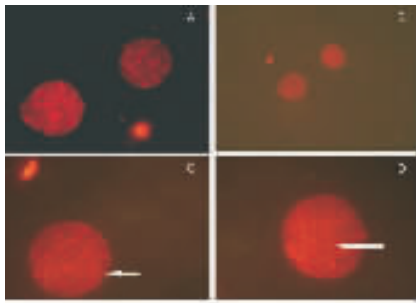


图 2 FISH 结果。A: 阴性对照间期核中未见 HBV DNA 整合信号; B: 二细胞胚中的 2 个间期核 (200×); C、D: 系 B 图放大, 两个子细胞间期核内可见 HBV DNA 阳性杂交信号 (箭头所示, 1 000×)

Figure 2 FISH result. A: no signal of HBV DNA integrated into each nucleus of the control; B: the nuclei of two-cell embryo (200×); C and D: the amplification of B, showing positive signals of HBV DNA integrated into each nucleus of two-cell embryo (arrows, 1 000×)

2.3 二细胞胚 RT-PCR 结果

每次 RT-PCR 试验用 15~30 个二细胞胚作测试样本。设置两个阴性对照, 一个阴性对照用水为模板, 另一个为胚胎细胞裂解后未加反转录酶。结果只在测试样本中出现特异的阳性条带, 两个阴性对照均无阳性条带 (图 3)。

2.4 二细胞胚免疫荧光检测结果

二细胞胚经血清封闭后, 分成两组。一组作检测样本, 另一组用 PBS 代替一抗 (小鼠抗人 HBsAg) 作为阴性对照, 其余实验条件完全相同。检测样本中可见阳性免疫荧光信号, 阴性对照均未见信号 (图 4)。

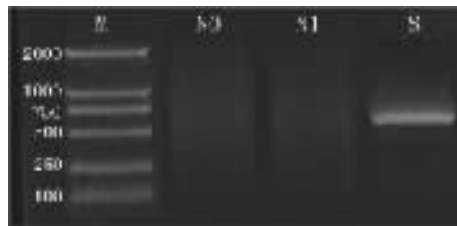


图 3 二细胞胚中 HBx 基因的 RT-PCR 产物。泳道 M: DNA Marker (DL2 000); 泳道 N0: 阴性对照 (模板为灭菌水); 泳道 N1: 阴性对照 (未加反转录酶); 泳道 S: 二细胞胚胎样本

Figure 3 RT-PCR product of HBx gene in two-cell embryo. Lane M: DNA marker (DL2 000); Lane N0: minus template control (-T); Lane N1: minus reverse transcriptase control (-RT); Lane S: two-cell embryos

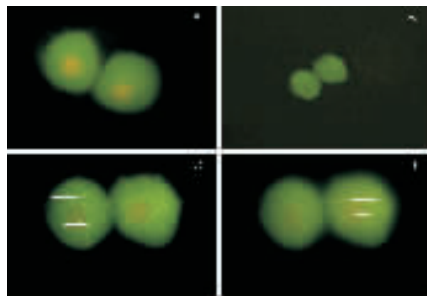


图 4 免疫荧光检测结果。A: 阴性对照, 未见阳性荧光信号; B、C、D 为同一个二细胞胚样本; B: 低倍镜 (200×); C、D: 两个子细胞胞浆中各有 2 个黄绿色荧光信号, 但不在同一个聚焦平面上 (箭头所示, 1 000×)

Figure 4 The results of immunofluorescence assay. A: no signal in negative control; B, C, D: the same two-cell embryo; B: the embryo in (200×); C and D: the positive signals within cytoplasm of each cell in two-cell embryo (arrows). Note: C and D have different focus, (1 000×)

3 讨论

目前, 关于 HBV DNA 经生殖细胞垂直传播途径的研究仍处于“假说”证实阶段。虽然已有学者应用斑点杂交, Southern 印迹以及 FISH 技术在各型乙肝患者和乙肝携带者的各级生精上皮细胞, 成熟精子内检测到了游离或整合的 HBV DNA^[11-13], 但它们能否经精子通过受精垂直传播给胚胎尚缺乏直接的科学实证据。2002 年, Huang 等^[14]用 FISH 在慢性乙型肝炎患者的精子染色体上观察到特异的 HBV DNA 杂交信号, 首次提供了 HBV DNA 在人精子染色体上整合的直接证据。最近, 本研究室 Ali 博士^[15]用脂质体包裹的 PBR322-HBV 质粒与正常人 (乙肝 2 对半检测 5 项全阴性) 捐献的精子共培养后与金黄地鼠卵进行体外受精, 并用 FISH 和 RT-PCR 技术检测到了 HBV 基因在早期胚胎中的复制和转录, 为 HBV 的父婴垂直传播提供了直接证据。

与 Ali 博士采用的体外培养体系不同, 我们将脂质体包裹的质粒直接注射到雄鼠体内, 模拟体内环境并从活体动物的整体效应来探讨携带了 HBV DNA 的精子能否顺利完成受精过程, 以及通过受精由精子携带到胚胎的 HBV 基因能否进行复制、转录和蛋白水平的表达。

首先用 FISH 检测了单细胞胚中 HBV 基因在雄性原核上的存在,检测到了 HBV DNA 阳性杂交信号(图 1),说明 HBV 基因注射到睾丸后,不但可以转染精子,而且携带 HBV 的精子可以完成受精过程,并在受精过程中将 HBV 基因带到受精卵。继后我们检测了在受精卵完成第一次卵裂之后,HBV 基因在二细胞中的状态(图 2),二细胞胚的两个子细胞核均发现 HBV DNA 阳性杂交信号,表明整合于宿主基因组内的 HBV DNA 随胚胎细胞分裂进行了复制。

我们应用 RT-PCR 证实了在二细胞胚中存在 HBV 基因的 mRNA(图 3)。为了保证 RT-PCR 结果的准确性,在胚胎细胞裂解之后,先用 DNase 处理,同时还设立了 2 个阴性对照,一个是在反转录过程中,用焦碳酸二乙酯(Diethyl pyrocarbonate, DEPC)水代替反转录酶与样本一起进行反转录合成 cDNA,排除了可能游离存在于胚胎中的 HBV DNA;在扩增的过程中,又设立一个阴性对照,用水代替模板 cDNA,进行扩增,这样一来就可以排除扩增过程中可能引起的污染。因此,样本能够扩增出 HBV 基因特异带,而阴性对照没有条带,提示在某些特定的条件下,整合到宿主基因组某些特定区域的 HBV DNA 是能够进行转录的。这一结果与 Ali 体外培养体系中的研究结果一致^[15]。在进行 RT-PCR 检测之后,又进一步用免疫荧光技术检测了 HBV 基因能否在二细胞胚中翻译出 HBsAg,从图 4 中,可以看到在二细胞胚的两个子代细胞中都有明亮的荧光信号,且分布于细胞浆中,该结果证明了 HBV 基因能够在小鼠早期胚胎中翻译出 HBV 的特异标记物。

我们的研究结果证实由精子带到卵母细胞中的 HBV 基因能够在胚胎细胞中复制和表达,首次为乙肝患者可能通过受染精子向子代传播 HBV 建立了体内研究的实验模型,为 HBV 的父婴垂直传播途径提供了直接的科学证据。

已有文献^[16-18]报道,将“外源基因注射到睾丸”作为制备转基因动物(testis-mediated gene transfer, TMGT)的一种手段,本文的研究结果再次证实了“睾丸介导途径”进行转基因的可行性。

(致谢:衷心感谢第二军医大学胡以平教授惠赠 pBR322-HBV DNA 重组质粒,衷心感谢四川大学翟朝阳教授在实验过程中给予我们的帮助。)

参考文献:

- [1] 张清健, 谢庆东, 黄天华. 乙型肝炎病毒垂直传播新途径的研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2003, 15(2): 121-123.
- [2] Hadchouel M, Scotto J, Huret JL, et al. Presence of HBV DNA in spermatozoa: a possible vertical transmission of HBV via the germ line [J]. *J Med Virol*, 1985, 16(1): 61-66.
- [3] Davison F, Alexander GJ, Trowbridge R, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa, urine, saliva and leucocytes, of chronic HBsAg carriers. A lack of relationship with serum markers of replication [J]. *J Hepatol*, 1987, 4(1): 37-44.
- [4] 郎振为, 孟忻, 肖桂兰, 等. 乙型肝炎患者睾丸组织中 HBV 分布的研究[J]. 中华医学杂志, 1993, 73(6): 329-331.
- [5] 王珊珊, 姜普林, 彭桂福, 等. 乙型肝炎病毒的父儿传播与肝外定位[J]. 中华肝脏病杂志, 1999, 7(4): 203-206.
- [6] Ogawa S, Hayashi K, Tada N, et al. Gene expression in blastocysts following direct injection of DNA into testis[J]. *J Reprod Dev*, 1995, 41(4): 379-382.
- [7] Sato M, Ishikawa A, Kimura M. Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible *in vivo* gene transfer system via epididymal spermatozoa[J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(1): 49-56.
- [8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 115-117.
- [9] 张清健, 黄天华, 谢庆东, 等. HBV DNA 重组质粒转染小鼠卵母细胞的研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(6): 324-327.
- [10] 吴德生, 王晓云, 吴丛梅, 等. 脂质体介导外源 DNA 体外转染金黄地鼠卵母细胞的研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(3): 137-141.
- [11] 徐德忠, 肖乐义, 沈孝宙, 等. 男性乙型肝炎病毒感染者体液与精子中的病毒 DNA [J]. 第四军医大学学报, 1991, 12(2): 103-106.
- [12] 赵连三, 刘晓松, 张智翔, 等. 乙型肝炎病毒感染经精子传播的可能性研究 [J]. 中华传染病杂志, 1998, 16(3): 154-157.
- [13] 徐小元, 王立荣, 凌晓明, 等. 精液在家庭 HBV 感染中的作用 [J]. 中华流行病学杂志, 1992, 13(6): 337-339.
- [14] Huang JM, Huang TH, Qiu HY, et al. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes [J]. *Asian J Androl*, 2002, 4(3): 209-212.
- [15] Ali BA, Huang TH, Xie QD, et al. Detection and expression of hepatitis B virus X gene in one and two-cell embryos from golden hamster oocytes *in vitro* fertilized with human spermatozoa carrying HBV DNA [J]. *Mol Reprod Dev*, 2005, 70(1): 30-36.
- [16] Sato M, Iwase R, Kasai K, et al. Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible alternative of sperm-mediated gene transfer [J]. *Animal Biotechnol*, 1994, 5(1): 19-31.
- [17] Yamazaki Y, Yagi T, Ozaki T, et al. *In vivo* gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker [J]. *J Exp Zool*, 2000, 286(2): 212-218.
- [18] 曹阳, 高华颖, 李庆伟, 等. 精子干细胞转染法制备转基因兔的研究 [J]. 高技术通讯, 2001, 10: 17-21.