

静脉途径 SHIV KU-1 恒河猴感染模型

一、艾滋病概述

艾滋病(Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS), 是由人免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)引起, 以全身免疫系统严重损害为特征的传染性疾病, 是 20 世纪危害人类健康和生命最严重的病毒性疾病之一。自美国 CDC 报道首例艾滋病后, 到 20 世纪 80 年代中期艾滋病发展成为一个全球性的流行病。截止 2014 年底, HIV 已感染 3690 万人, 2014 年新增感染者 200 万, 2014 年因艾滋病死亡 120 万人。艾滋病在 1985 年传入我国, 截至 2015 年 5 月 31 日, 全国历年累计报告艾滋病 530628 例, 其中艾滋病病人 217457 例, 死亡 167159 例。艾滋病早已成为全球关注的公共卫生和社会热点问题, 艾滋病的预防与治疗也成为当代生物医学研究的前沿热点之一。

二、艾滋病动物模型简介

艾滋病发病机制研究、药物和疫苗的保护性研究及评价等方面在很大程度上依赖理想的动物模型。SIV/SAIDS(猴艾滋病)模型被广泛接受和应用, 表现为和 AIDS 的临床表征, 发病过程、免疫缺陷特征等非常相似。然而, 由于 HIV 与 SIV 毕竟是两种不同的病毒, 它们在基因序列、包膜结构和抗原性之间存在一定差异, 使该模型的使用有一定的局限性。近年来, 人们应用分子生物学技术, 将 HIV-1 重要基因与 SIV 做成嵌合体病毒(SIV/HIV-1, 简称为 SHIV)感染恒河猴, 用以研究 HIV 不同基因的功能以及病毒与宿主的相互作用。

SHIV KU-1 是 SHIV-HXBc2 经恒河猴和猪尾猴系列传代得到的一株 SHIV 强毒株, 它具有 CXCR4 嗜性, 能在短期内引起感染猴外周血 CD4⁺T 细胞的耗竭, 继而导致实验猴发病甚至死亡。

艾滋病的三种传播途径分别是经血液、性和母婴传播, 性传播包括同性传播和异性传播两种方式。艾滋病动物模型的制备首先要考虑其实际应用价值, 最好的动物模型可以最大限度的模拟人类疾病, 包括使用与自然感染相同或接近的方式建立模型。为充分模拟静脉注射吸毒人群的感染方式, 通过静脉途径, 病毒直接感染血液中的靶细胞, 从而制备静脉途径艾滋病恒河猴感染模型。

三、静脉途径 SHIV KU-1 恒河猴感染模型制作方法

- 1、实验用病毒: 感染毒株为 SHIV KU-1 中国恒河猴细胞适应株, 中国恒河猴 PBMCs 滴定 TCID₅₀ 滴度为 10^{3.75} TCID₅₀/mL。
- 2、感染动物: 选用体重 4-6 kg 的 SPF 恒河猴。实验前体检无异常, 必须排除猴免疫缺陷病毒(SIV)、猴逆转录 D 型病毒(SRV-1, 2, 5)和猴 T 淋巴细胞性 I 型病毒(STLV-1)的感染。猴免疫缺陷病毒(SIV)易感性密切相关的 4 种基因(Mamu-A*01、Mamu-A*02、Mamu-B*08、Mamu-B*17)筛查结果为阴性。所有感染动物必须在 ABSL-3 室中进行。
- 3、感染方法: 用 0.4 ml SHIV KU-1 病毒原液经后肢静脉接种恒河猴。
- 4、SHIV KU-1 静脉感染猴样品采集和指标测定: 感染前和感染后按指定时间点采集 EDTA

抗凝血 4mL，分别测定血常规、血浆病毒载量、CD4⁺/CD8⁺、CD4⁺细胞绝对数。

5、SHIV KU-1 静脉感染猴血浆病毒载量的测定：提取 EDTA 抗凝血浆中病毒 RNA，使用 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法测定血浆病毒载量。

6、SHIV KU-1 静脉感染猴外周血 CD4⁺/CD8⁺比值及绝对数测定：CD3-PerCP、CD4-FITC、CD8-PE 抗体标记 EDTA 抗凝全血淋巴细胞，流式细胞仪测定 CD4⁺/CD8⁺比值，并根据血常规结果，计算出 CD4⁺T 细胞绝对数。

四、静脉途径 SHIV KU-1 恒河猴感染模型指标检测

1、临床症状

G1301V 在长期感染过程中，健康状况良好，无典型感染症状。G1302V 在感染前期状态良好，但自感染 350d 后精神逐渐萎靡，长期慢性腹泻，于感染后 457d 死亡。

2、SHIV KU-1 静脉感染恒河猴外周血病毒载量结果

两只实验猴（G1301V 和 G1302V）都在感染后第 4d 就检出了血浆病毒载量，其后一直在 1.0×10^4 copies/mL 左右波动，没有出现明显的载量高峰（图 1）。

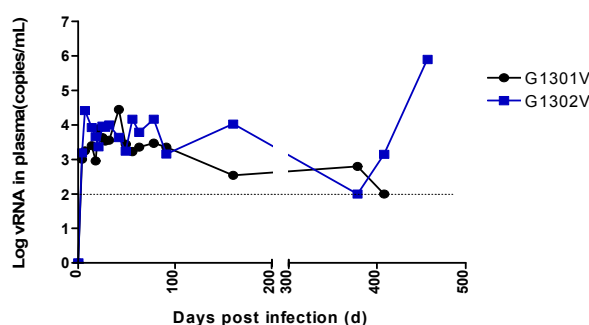


图 1 SHIV KU-1 静脉感染中国恒河猴外周血病毒载量结果

Fig.1 The viremia (viral RNA copies/ml plasma) in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV KU-1

3、SHIV KU-1 静脉感染恒河猴 CD4⁺/CD8⁺比值结果

感染后外周血中 CD4⁺/CD8⁺都有一个明显下降过程（图 2）。G1301V 在感染后的 3w 内从感染前的 1.96 下降到 0.50，短暂徘徊后持续上扬，至 3 个月，已基本恢复至初始水平，达到 1.53；G1302V 感染前 1.21，感染后 3w 降至 0.1，其后稳定在 0.2 左右，至感染后 400d 下降接近 0。

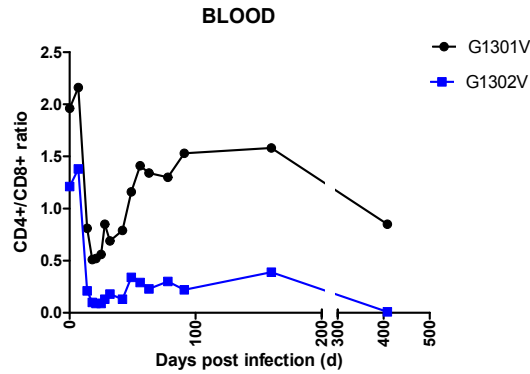


图 2 SHIV KU-1 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值

Fig.2 The changes of CD4⁺/CD8⁺ ratio of T lymphocytes in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV KU-1

4、SHIV KU-1 静脉感染恒河猴 CD4⁺细胞绝对数结果

两只猴 G1301V 和 G1302V 在 CD4⁺T 细胞绝对数上变化基本相同（图 3）。感染后外周血 CD4⁺T 细胞数迅速下降，3w 后分别从感染前 990 个/mL、1300 个/mL 下降到最低点 420 个/mL 和 76 个/mL，其后基本保持水平，3 个月时为 590 个/mL 和 180 个/mL。G1302V 在感染后期一直维持在 100 个/mL 以下。

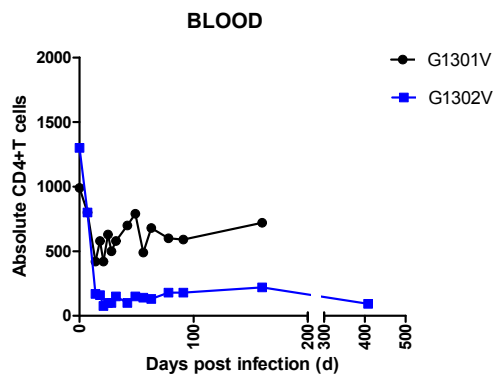


图 3 SHIV KU-1 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数

Fig.3 The CD4⁺ T cell counts (per 1 blood) in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV KU-1

五、模型发表文章

1. 丛喆, 蒋虹, 苏爱华, 王卫, 陈霆, 薛婧, 魏强. CXCR4嗜性SHIVKU-1病毒静脉感染中国恒河猴初步研究. 中国比较医学杂志, 2013, 23(6): 53-57. Characterization of a Chinese-origin rhesus macaque model of X4-tropic pathogenic SHIVKU-1 infection by intravenous injection. CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE. 2013, 23(6): 53-57.

2. 丛喆, 徐珮, 董志会, 陈霆, 蒋虹, 魏强.SHIVKU-1感染猴感染晚期血浆病毒分离结果分析. 医学动物防制, 2014,30(12):1361-1367. Analysis of the Virus Isolation Result from Late-stage Plasma of Rhesus Macaques Infected with SHIVKU-1. J Med Pest Control, 2014,30(12):1361-1367.