

静脉途径 SHIV-KB9 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。

Reimann 等人以 SIVmac239 病毒基因组和 B 亚型 HIV-1 病毒的 env 基因为主体构建的一株嵌合病毒, 即 SHIV-89.6, 经动物体内传代及克隆得到 SHIV-KB9。由于在中国流行的 8 种类型毒株中, B'亚型是我国目前主要流行的 HIV-1 亚型, 占 47.5%。我国 HIV-1 B'亚型毒株与 B.TH.92.92TH014 最为接近, 中国 HIV-1 B'亚型标准株的核苷酸序列与国际常用 HMA 分型的 TH14、IND868、MA959、TH22 等序列比较, 相应亚型的核苷酸同源性是: B 亚型 90.2%, 88.3%, 说明 B 亚型和 B'亚型之间存在很高的亲缘性。因此, SHIV-KB9 病毒建立的动物模型, 对我国的艾滋病疫苗以及疫苗评价和应用意义重大, 为我国的疫苗研制提供很好的研究和评价平台。

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-KB9 恒河猴感染模型制作方法

- 1、实验用病毒: 感染毒株为 SHIV-KB9 中国恒河猴细胞适应株, RT-PCR 测定病毒拷贝数为 4.8×10^8 copies/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：4 只恒河猴编号分别为 A0423、A0424、A0425 和 A0426。病毒原液依次用无血清 1640 培养液做 10 倍系列稀释。经后肢静脉感染，每只猴注射 1mL 稀释好的病毒液。A0423-A0426 分别注射 10^{-1} - 10^{-4} 病毒液 1mL。持续测定 8 个月。
- 4、SHIV-KB9 静脉感染猴样品采集和指标测定：在感染前和感染后 3、7、10、14、17、21、28、35、42、49、56、70 及 84 天采集猴静脉血 6mL，3mL EDTA 抗凝，用于病毒载量和 CD4⁺/CD8⁺值测定。
- 5、SHIV-KB9 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-KB9 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-KB9 恒河猴感染模型指标检测

1、临床症状

感染 SHIV-KB9 病毒后，A0425 在感染后第 120 天出现食欲不振、水样腹泻、掉毛和体重减轻，到感染后第 130 天发展至严重水样腹泻，至 18 周后，愈发虚弱，直至感染后 149 天濒临死亡，动物安乐处死，并按计划取材留样。其余感染猴未出现皮疹、体重下降、食欲不振、机会性感染等典型的艾滋病症状。

2、SHIV-KB9 静脉感染恒河猴外周血病毒载量结果

在血浆病毒载量方面，A423 和 A424 在感染后第 7 天首次出现阳性，之后载量上升，A423 于感染后第 14 天达到它的最高峰 (9.62×10^7 copies/mL)，之后缓慢下降，但在我们的观察期 (161 天) 内，一直维持在 10^3 copies 水平之上。A424 在感染后第 10 天达到一个高峰 (5.333×10^5 copies/mL)，之后在 10^3 - 10^6 之间波动，到感染后第 56 天达到它的另外一个高峰 (6.082×10^6 copies/mL)，后在我们的观察期内未检测到病毒载量。A0425 病毒载量在 28 天为 7.22×10^5 copies/mL，35 天达到高峰 3.51×10^8 copies/mL，随后下降，至 10w 降到了 10^4 copies/mL，之后出现反弹，达到 4.11×10^6 copies/mL，并长期维持在这个水平上直至发病。A426 动物在整个实验期间，未检测到血浆病毒载量阳性 (图 1)。

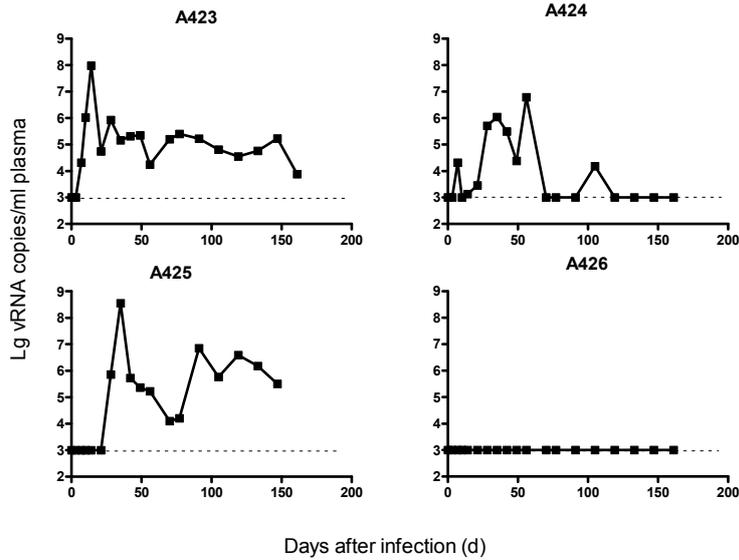


图 1 SHIV-KB9 静脉感染中国恒河猴外周血病毒载量结果

Fig.1 The viremia (viral RNA copies/ml plasma) in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV-KB9

3、SHIV-KB9 静脉感染恒河猴 CD4⁺/CD8⁺比值结果

四只实验猴 CD4⁺/CD8⁺比例结果显示,实验前,其比值均大于 1。接种病毒后,A423-A425 在感染后前 5 周有个下降—回升—再下降的过程,其中 A423 于感染后 21 天降至最低值 0.15,之后缓慢回升,在 161 天之前都在 0.5 之下徘徊,之后进入波动期,在 0.26-0.78 之间波动,但总体趋势是上升的,并于感染后 357 天回升至 1.08。A424 在前五周有几个幅度较大的波动,并于感染后 35 天达到最低点 0.48,之后缓慢回升,从第 35 天的 0.48 一直波动回升到第 329 天的 1.67。A425 的初始 CD4⁺/CD8⁺比值是四只猴中最高的,它在感染后第 35 天 CD4⁺/CD8⁺比值达到最低点 0.0125,之后缓慢回升,但一直维持在 0.2 以下,直至安乐处死。A426 的 CD4⁺/CD8⁺比值在前三个月一直未见异常变化,到感染后 91 天出现下降,之后回升,维持于 1 附近(图 2)。

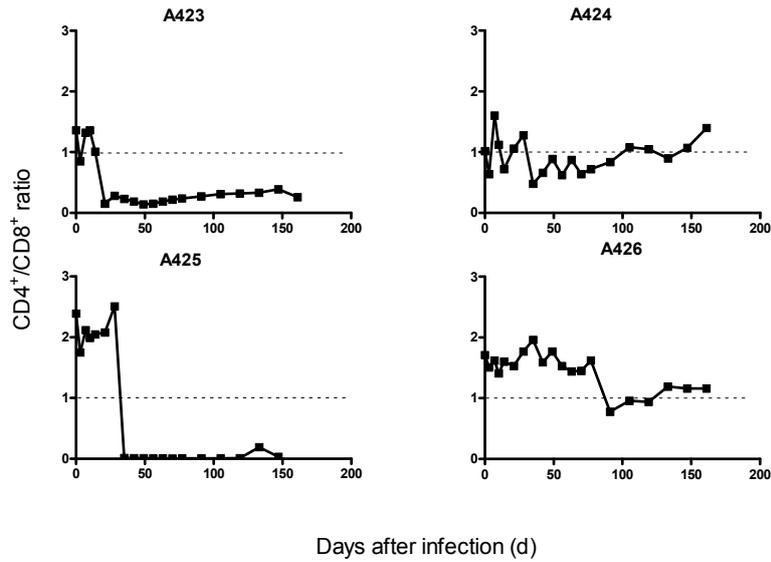


图 2 SHIV-KB9 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值

Fig.2 The changes of CD4⁺/CD8⁺ ratio of T lymphocytes in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV-KB9

4、SHIV-KB9 静脉感染恒河猴 CD4⁺细胞绝对数结果

病毒感染前, A4023-A0426 四只猴的 CD4⁺ T 细胞绝对数都在 1000 个/ μ L 以上。SHIV-KB9 感染后, 四只猴在感染后前三周都有个上升—下降—再上升—再下降的过程, (图 3)。A0423 在感染后 21 天到达最低点每 μ L 血液中 244 个 CD4⁺细胞, 之后缓慢上升, 到感染后 203 天超过 1000 个/ μ L。A0424 在感染后 28 天到达最低点每 μ L 血液中 418 个 CD4⁺细胞, 之后波动上升, 到感染 7 周之后超过 1000 个/ μ L。A0425 对 SHIV-KB9 的反应最强烈, 在感染后 3 天它的 CD4⁺ T 细胞绝对数从最初的 1073 个/ μ L, 迅速升到 4270 个/ μ L, 到第 10 天更是升至 5254 个/ μ L, 之后迅速下降, 到感染后 35 天降为 16 个/ μ L, 并维持这个水平一直到安乐。A0426 也是在感染后 28 天到达最低点每 μ L 血液中 465 个 CD4⁺细胞, 之后波动上升, 到感染 11 周之后超过 1000 个/ μ L。

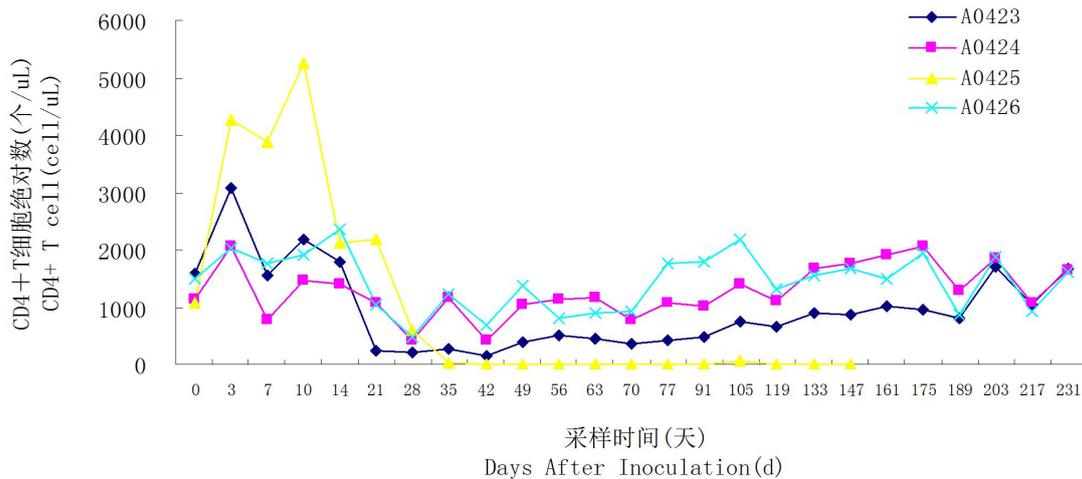


图 3 SHIV-KB9 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数

Fig.3 The CD4⁺ T cell counts (per l blood) in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV-KB9

五、模型发表文章

1. 王卫, 刘强, 许琰, 冯育芳, 丛喆, 佟巍, 蒋虹, 杨贵波, 魏强, 秦川. SHIV-KB9 感染中国恒河猴动物模型的建立. 中国比较医学杂志, 2011, 21 (2): 1-6. Establishment of a Chinese-Origin Rhesus Macaque Model of SHIV-KB9 Virus Infection. CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE, 2011, 21 (2): 1-6.
2. 丛喆, 陶真, 王卫, 陈霆, 金光, 姚南, 苏爱华, 魏强. SHIV-KB9病毒中国恒河猴细胞适应株的制备. 中国畜牧兽医, 2012, 39(3): 23-27. The Propagation and Evaluation of SHIV-KB9 adaptive virus stock in Chinese original Rhesus Macaques. CHINA ANIMAL HUSBANDRY & VETERINARY MEDICINE. 2012, 39(3): 23-27.
3. Yue Li, Qiang Liu, Zhenwu Luo, Yan meng Feng, Zhe Li, Qiang Wei and Y iming Shao. Partial Protection of SHIV-Infected Chinese Rhesus Macaques Against Super-Infection with Heterologous SHIV Isolate. Current HIV Research, 2012, 10, 627-635.
4. Wang W, Cong Z, Jiang H, Chen T, Jin G, Xiong J, Qin C, Wei Q. Comparison of viral burden and disease progression in Chinese-origin rhesus macaques infected with common experimentally applied chimeric virus: SHIV-1157ipd3N4, SHIV-162P3, or SHIV-KB9. J Med Primatol. 2014 Aug; 43(4): 247-57.