

阴道途径 SHIV-1157ipd3N4 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。

R. M. Ruprecht 以 SHIV-KB9 为骨架构建了表达 HIV-1 C 亚型 env 的 SHIV-1157i, 并经静脉途径感染印度恒河猴得到 SHIV-1157ipd3N4。它所具有高度复制能力的、CCR5 受体嗜性、经粘膜传播这些特性, 使它在研究 HIV 感染和发病机制及评价 AIDS 候选疫苗的功效方面具有重要的现实意义。

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。为模拟异性间性传播的感染方式, 通过阴道粘膜上皮途径接种病毒, 病毒可能直接感染郎格汉斯细胞、上皮细胞等。在灵长类动物 AIDS 模型的研究中发现体内注入黄体酮可促进 SIV/SHIV 传播, 而雌激素则抑制 SIV/SHIV 传播, 可能与这些激素能影响阴道壁厚度或通过 IL-2 等影响 CCR5 和 CXCR4 受体表达有关。在合适的生理周期或使用一定量的黄体酮的情况下, 用导尿管将病毒缓慢注入猴阴道内, 可建立异性性传播动物模型。

三、阴道途径 SHIV-1157ipd3N4 恒河猴感染模型制作方法

- 1、实验用病毒: 感染毒株 SHIV-1157ipd3N4, 病毒原液滴度为 1×10^6 TCID₅₀/mL (TZM-bl 细胞滴定)。
- 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：将麻醉好的实验猴放在操作台上，动物采取俯卧位，后肢抬高，暴露阴道口。用 2mL 预冷的无菌 PBS 清洗阴道。再将稀释好的适当浓度的病毒液 1mL 缓慢推入。实验猴保持此姿势 30min。
- 4、SHIV-1157ipd3N4 阴道感染猴样品采集和指标测定：感染采取小量多次的方法,共感染 11 次。前 3 次使用 20TCID₅₀ 的 SHIV1157ipd3N4 病毒,后 8 次使用 10TCID₅₀ 的病毒,间隔 4-8d, 进行阴道感染。在每次感染前及 11 次感染结束后定期采 EDTA 抗凝血 3ml, 分别测定 CD348 及血浆病毒载量。
- 5、SHIV-1157ipd3N4 阴道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-1157ipd3N4 阴道感染猴外周血 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、阴道途径 SHIV-1157ipd3N4 恒河猴感染模型指标检测

1、SHIV-1157ipd3N4 阴道感染恒河猴外周血病毒载量结果

7-1 到 7-5 猴都在初次感染后 11d 出现血浆病毒载量, 高峰期载量都在 10⁶copies/mL 以上, 其中 3 只在 10⁷copies/mL 以上。7-2 和 7-5 在初次感染后 38d 血浆病毒载量转阴, 且持续至感染后 111d, 急性期病毒载量只维持了 20d。其余 3 只猴 7-1, 7-3, 7-4 急性期时间较长, 且维持在 10⁴copies/mL 左右。7-6 在初次感染后 63d 首次检出血浆病毒载量, 高达 3.336×10⁷copies/mL, 至 139d 转阴 (图 1)。

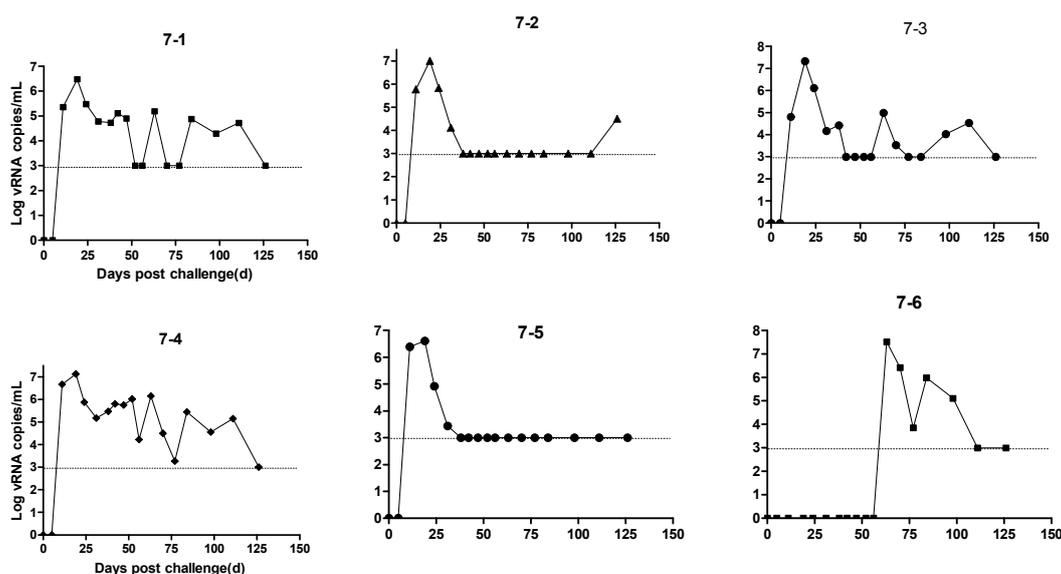


图 1 SHIV-1157ipd3N4 小剂量多次阴道途径感染中国恒河猴血浆病毒载量结果
 Fig.1 The viremia (viral RNA copies/ml plasma) in Chinese-original rhesus macaques infected IVAG with repeated low dose of SHIV-1157ipd3N4

2、SHIV-1157ipd3N4 阴道感染恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺比值结果

6 只实验猴的 CD4⁺/CD8⁺比在病毒载量出现后均有一个短期内快速下降并迅速反弹的过程。除 7-4 和 7-6 外，其他 4 只实验猴均未出现明显倒置，但 CD4⁺/CD8⁺比值有逐渐降低的趋势。7-4 在载量高峰时 CD4⁺/CD8⁺降到了 0.5，反弹后在 70d 再次降到 0.5 并逐渐维持在这个水平上。7-6 在载量高峰时（70d）CD4⁺/CD8⁺降到了 0.62，随后逐渐上升，至 110d 时已恢复至 1.0 左右（图 2）。

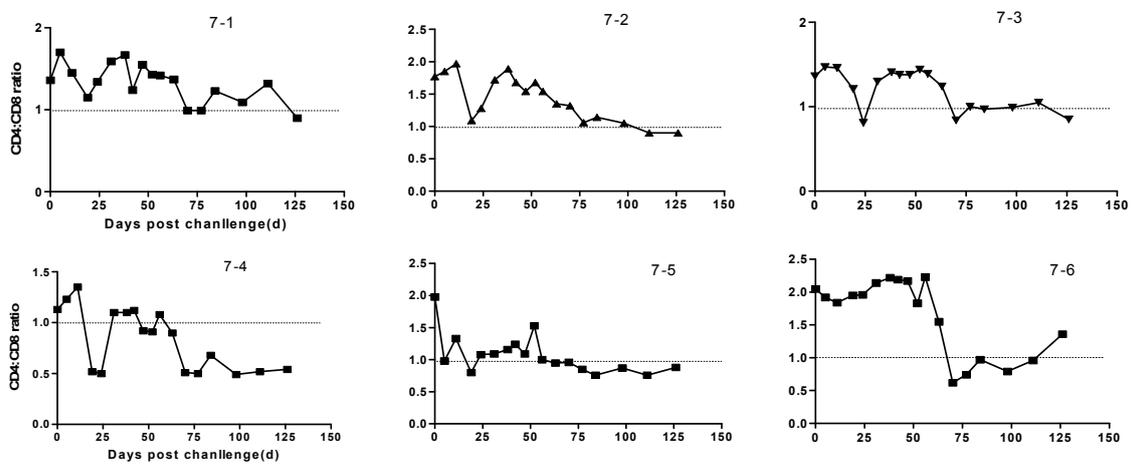


图 2 SHIV-1157ipd3N4 小剂量多次阴道途径感染中国恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺比值
 Fig.2 The changes of CD4⁺/CD8⁺ ratio of T lymphocytes in Chinese-original rhesus macaques infected IVAG with repeated low dose of SHIV-1157ipd3N4

3、SHIV-1157ipd3N4 阴道感染恒河猴外周血 CD4⁺T 细胞绝对数结果

7-1 到 7-6 实验猴的 CD4⁺细胞绝对数在感染 50 天内都基本保持稳定，在 1000 个/ μ L 全血上下浮动，随后均有逐步下降，但下降幅度不大，最低值始终在 600 以上（具体数据未显示）。只有 7-1 从 77d 起有一次大幅下降，到感染后 98d 时，已降到 222 个细胞/ μ L 猴血（见图 3），随后迅速反弹至 1000 以上（图 3）。

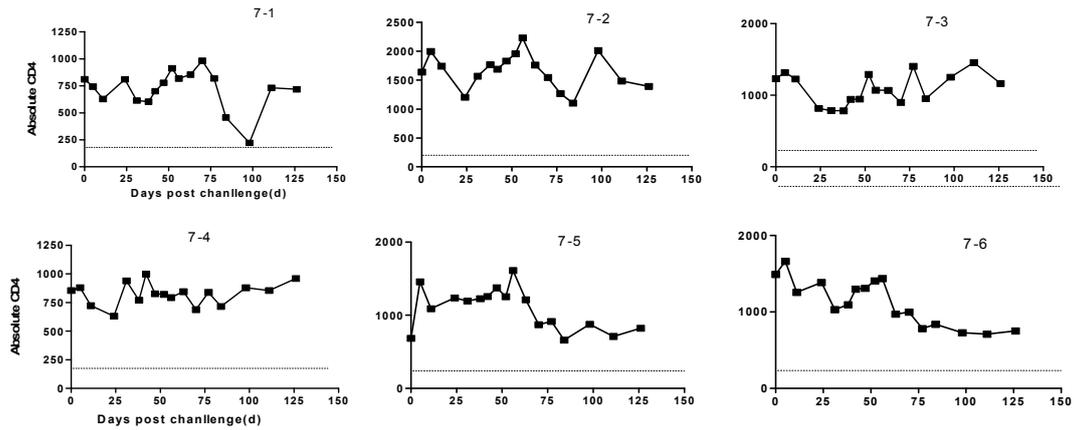


图 3 SHIV-1157ipd3N4 小剂量多次阴道途径感染恒河猴外周血 CD4⁺T 细胞绝对数变化

Fig.3 The CD4⁺ T cell counts (per 1 blood) in Chinese-origin rhesus macaques infected with SHIV-1157ipd3N4 with repeated low dose of SHIV-1157ipd3N4

五、模型发表文章

1. 丛喆, 蒋虹, 金光, 王卫, 高虹, 姚南, 陶真, 陈霆, 杨志伟, Sylvain.Fleury, Anick Chalifour, Ruth.M.Ruprecht, 魏强, 秦川. SHIV1157ipd3N4 小量多次阴道粘膜感染中国猕猴的初步研究. 实验动物与比较医学, 2011, 31 (1): 38-42. Efficient Repeated Low-dose Intravaginal Infection with SHIV1157ipd3N4 in Rhesus Monkey. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2011, 31 (1): 38-42.