

静脉途径 SHIV_{SF162P3} 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。

美国洛克菲勒大学的 Aaron Diamond 艾滋病研究中心 Cecelia 教授以 SIV_{mac239} 为骨架替换 HIV-1_{SF162} (R5,MT/NSI) 的 *env*, *tat*, *rev*, *vpu* 等基因构建了表达 HIV-1 B 亚型 *env* 的 SHIV_{SF162PC}, 经恒河猴体内传代得到 SHIV_{SF162p3}。它具有高度复制能力、CCR5 受体嗜性, 并且能经粘膜传播, 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_{SF162p3} 恒河猴感染模型制作方法

- 1、实验用病毒: 感染毒株为 SHIV_{SF162p3} 中国恒河猴细胞适应株, 中国恒河猴 PBMCs 滴定 TCID₅₀ 滴度为 5×10^3 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：10 只恒河猴随机分为 6 个剂量组，由 10^{-1} 至 10^{-6} ，分别经后肢静脉感染稀释好的病毒液 1mL。G0802V (10^{-1} , 500TCID₅₀)、G0803V、G0804V (10^{-2} , 50TCID₅₀)，G0805V、G0806V (10^{-3} , 5TCID₅₀)，G0807V、G0808V (10^{-4} , 0.5TCID₅₀)，G0809V、G0810V (10^{-5} , 0.05TCID₅₀)，G0811V (10^{-6} , 0.005TCID₅₀)。
- 4、SHIV_{SF162p3} 静脉感染猴样品采集和指标测定：在感染前和感染后 7、14、21、28、42、56、70 及 84d 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_{SF162p3} 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_{SF162p3} 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_{SF162p3} 恒河猴感染模型指标检测

1、SHIV_{SF162p3} 静脉感染恒河猴外周血病毒载量结果

10^{-1} 感染猴 G0802V 和 10^{-2} 感染猴 G0803V 在感染后 7d 血浆就检出 10^4 - 10^5 copies/mL 的病毒载量，另一只 10^{-2} 感染猴 G0804V 和 10^{-3} 感染猴 G0805V、G0806V 也在 14d 转阳。5 只感染猴的病毒载量高峰峰值均在 10^6 - 10^7 copies/mL 之间。感染后 28d-42d 载量下降，但 G0802V 一直维持阳性直到感染后 88d。 10^{-2} 感染猴 G0804V 在下降后转阴，G0803V 在 10^3 - 10^4 copies/mL 之间浮动。 10^{-3} 感染猴 G0805V 与 G0804V 情况一致，G0806V 则在 42d 反弹，载量维持在 10^3 - 10^4 copies/mL 之间（图 1）。其它实验猴在整个观察期间未见载量阳转。

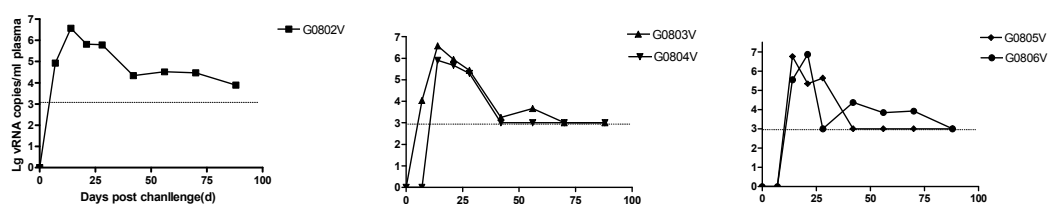


图 1 SHIV_{SF162p3} 静脉感染中国恒河猴外周血病毒载量结果

Fig.1 The viremia (viral RNA copies/ml plasma) in Chinese-original rhesus macaques infected intravenously with SHIV_{SF162p3}

2、SHIV_{SF162p3} 静脉感染恒河猴 CD4⁺/CD8⁺比值结果

5 只感染猴在感染后均有 CD4⁺/CD8⁺比值的下降（图 2）。除 10^{-2} 感染猴 G0804V 外，其它 4 只感染猴下降幅度均较大。但下降后 10^{-3} 感染猴 G0805V、G0806V 很快回升到原来的水平，而 10^{-1} 感染猴 G0802V 和 10^{-2} 感染猴 G0803V 在很长时间内在 1 以下徘徊，直到感染后 88d 才升到 1 以上。

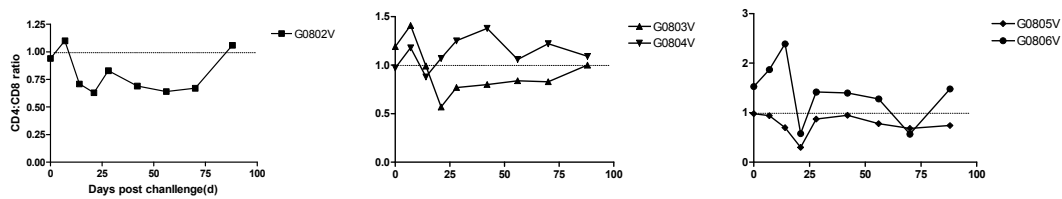


图 2 SHIV_{SF162p3} 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值

Fig.2 The changes of CD4⁺/CD8⁺ ratio of T lymphocytes in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV_{SF162p3}

3、SHIV_{SF162p3} 静脉感染恒河猴 CD4⁺细胞绝对数结果

5 只感染猴外周血中 CD4⁺T 淋巴细胞的变化不是很明显，基本在一个水平上下浮动，没有明显的升高和降低（图 3）。

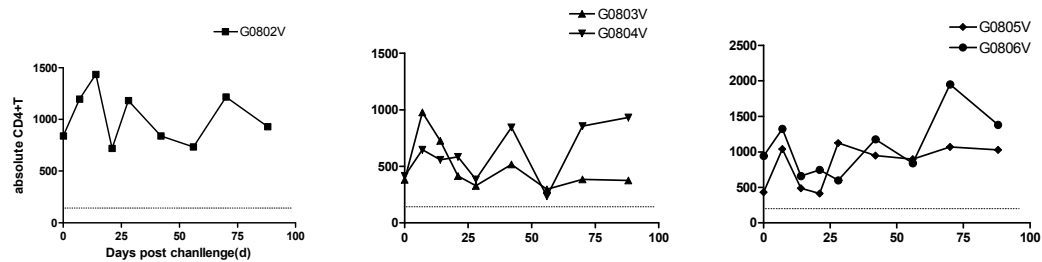


图 3 SHIV_{SF162p3} 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数

Fig.3 The CD4⁺ T cell counts (per 1 blood) in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV_{SF162p3}

五、模型发表文章

1. 丛喆, 蒋虹, 王卫, 陈霆, 金光, 陶真, 姚南, 熊竞, 吴芳新, 耿祥飞, 魏强. SHIVSF162p3 中国恒河猴细胞适应株静脉感染中国恒河猴有效浓度的确定[J]. 医学动物防制. 2010. 26(10): 883-884.
2. 熊竞, 丛喆, 王卫, 陈霆, 吴芳新, 刘克剑, 苏爱华, 鞠斌, 魏强. SHIVSF162P3 病毒感染急性期复制水平与慢性期 CD4⁺T 细胞亚群分布及频度相关性分析. 中国病毒病杂志, 2012,2 (5): 354-359. Experimental infection of SHIVSF162p3 in rhesus macaques: correlation analysis of the viral RNA levels in the acute phase and the distribution of CD4⁺T cell subsets in the chronic phase. Chin J Viral Dis, 2012,2 (5): 354-359.
3. Xue J, Cong Z, Xiong J, Wang W, Jiang H, Chen T, Wu F, Liu K, Su A, Ju B, Chen Z, Couto MA, Wei Q, Qin C. Repressive effect of primary virus replication on superinfection correlated with gut-derived central memory CD4⁺ T cells in SHIV-infected Chinese rhesus macaques. PLoS One. 2013 Sep 2;8(9):e72295.

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.