

直肠途径 SIVmac239 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、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。人们发现 HIV 以后, 用 HIV 感染过多种动物, 但由于种种原因, 结果并不理想。研究发现猴免疫缺陷病毒(SIV)感染实验用猴的模型效果比较理想, 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, 加之 HIV 和 SIV 有一定的基因同源性, 人和猴的生物学特性也较其他动物接近, 因而, SIV/SAIDS(猴艾滋病)模型被广泛接受和应用。

SIV 是猴获得性免疫缺陷综合征(Simian Immune Deficiency Syndrome, SAIDS)的主要致病病毒, 为典型的 C 型病毒粒子, 基因组长度大约为 9.2kb, 基因组成同 HIV-1 和 HIV-2 基本相同, 其完整的原病毒基因含有二个 LTR 以及同 HIV 类似的基因: *gag*、*pol*、*vif*、*tat*、*rev*、*env* 和 *nef*。所有基因在 SIV 的排列顺序同 HIV 完全一样。目前国内外对 SIV 的研究多集中在非克隆株 SIVmac251 和克隆株 SIVmac239 上, 因为这两个病毒株能在多种猕猴属动物身上引发致死性免疫缺陷综合征, 同时伴有 CD4⁺淋巴细胞下降, 继发机会性感染病毒性脑膜脑病。这些都与人类 AIDS 类似。

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。为模拟同性间性传播的感染方式, 通过直肠粘膜上皮途径感染, 病毒直接感染 M 细胞、上皮细胞等。直肠的生理构造及上皮细胞厚度非常薄等特点, 都使直肠感染较阴道感染容易发生。将病毒缓慢注入猴直肠内, 可建立同性性传播动物模型。

三、直肠途径 SIVmac239 恒河猴感染模型制作方法

- 1、实验用病毒: 感染毒株为 SIVmac239 中国恒河猴细胞适应株, 使用中国恒河猴 PBMCs 扩增制备, CEMx174 细胞滴定 TCID₅₀ 为 3×10^5 /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：将麻醉好的实验猴放在操作台上，动物采取俯卧位以保证直肠粘膜充分暴露，缓慢将 SIVmac239 中国恒河猴细胞适应株的稀释液注入肛窦处，实验猴保持此姿势 30min。
- 4、SIVmac239 直肠感染猴样品采集和指标测定：用 DMEM 培养基稀释成 100TCID₅₀/3mL 和 1000TCID₅₀/3mL 两种浓度，采用小剂量多次直肠暴露的方式感染，3mL/只。共接种 10 次，2 次/周。在每次感染前及 10 次感染结束后定期采 EDTA 抗凝血 3ml，分别测定血常规、血浆病毒载量、CD4⁺/CD8⁺、CD4⁺和 CD8⁺细胞绝对数。
- 5、SIVmac239 直肠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、SIVmac239 直肠感染猴外周血 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⁺和 CD8⁺细胞绝对数。

四、直肠途径 SIVmac239 恒河猴感染模型指标检测

1、SIVmac239 直肠感染恒河猴血浆病毒载量结果

SIVmac239 感染 10 次之后，恒河猴 G0101R-G0108R 均已被感染，血浆病毒 RNA 载量和载量峰值的时间点各不相同。其中，G0103R，G0107R 和 G0108R 这三只猴在感染后病毒载量直接到达高峰，并出现典型的疾病进程，其中 G0103R 第 14 天时达到高峰，峰值约 10⁶copies/mL，G0107R 和 G0108R 在感染后第 28 天达到峰值，这三只猴的病毒载量出现相对较早；G0102R，G0104R 和 G0105R 在感染后 2-3 周病毒载量呈现低拷贝复制状态，波动在 10²-10³ copies/mL 之间，而到 40 天时，病毒载量才达到高峰，上升到 10⁶copies/mL；而 G0101R 和 G0106R 的病毒载量一直处于临界值，时有时无，从未达到病毒载量的高峰。根据病毒载量的情况及变化规律（图 1）。8 只恒河猴可分成三组类型：G0101R 和 G0106R 划分为第一组（典型疾病进展型），将 G0102R，G0104R 和 G0105R 划分为第二组（延迟进展型），将 G0103R，G0107R 和 G0108R 划分为第三组（隐匿型）。

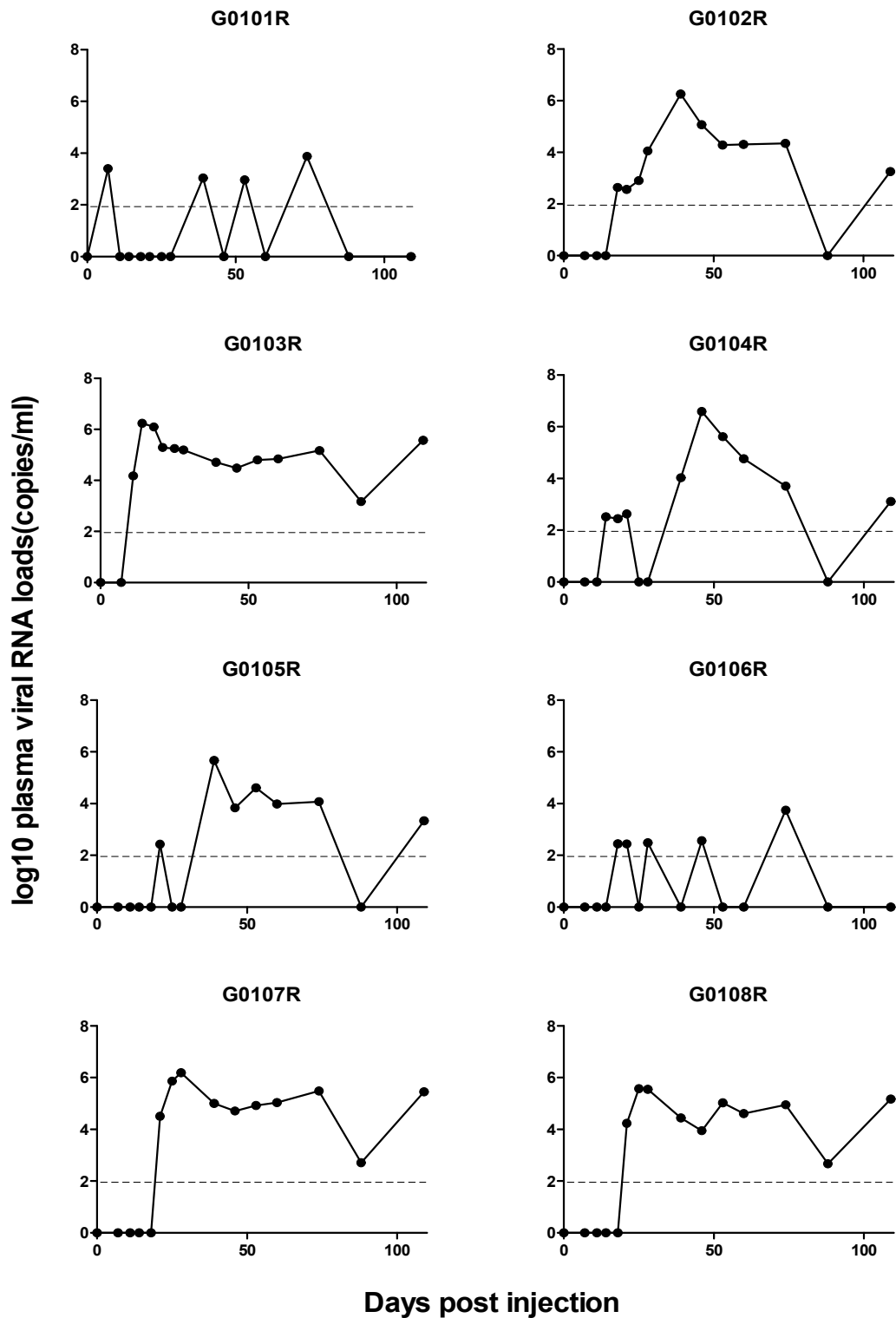


图 1 SIVmac239 小剂量多次直肠途径感染中国恒河猴血浆病毒载量结果
 Fig.1 The viremia (viral RNA copies/ml plasma) in Chinese-origin rhesus macaques infected intrarectally with repeated low dose of SIVmac239

2、SIVmac239 直肠感染恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺比值结果

外周血中 CD4⁺/CD8⁺的比例变化除 G0103R 在第 88 天时出现明显倒置外，其余恒河猴

外周血中 CD4⁺/CD8⁺的比例在整个感染过程中均未出现倒置现象。G0101R 和 G0106R 猴 CD4⁺/CD8⁺的比例变化在感染后 46 天时呈现逐渐增加的趋势，但到感染后第 88 天时，其比例又恢复到接近感染前的水平，波动在 1.4-2.4 之间。G0102R，G0104R 和 G0105R 猴 CD4⁺/CD8⁺的比例在感染后第 7 天时有所增加，随后一直平稳维持在 1.5-2.5 之间，到第 88 天时，其比例有所下降，并出现 CD4⁺/CD8⁺比例倒置现象，其比例约为 0.9 左右。G0103R，G0107R 和 G0108R 猴以 G0103R 变化最明显，其比例呈现逐渐下降的趋势，到第 88 天时，CD4⁺/CD8⁺比例下降到 0.39，其余两只猴未出现 CD4⁺/CD8⁺比例倒置现象，波动在 1.1-1.3 之间（图 2）。

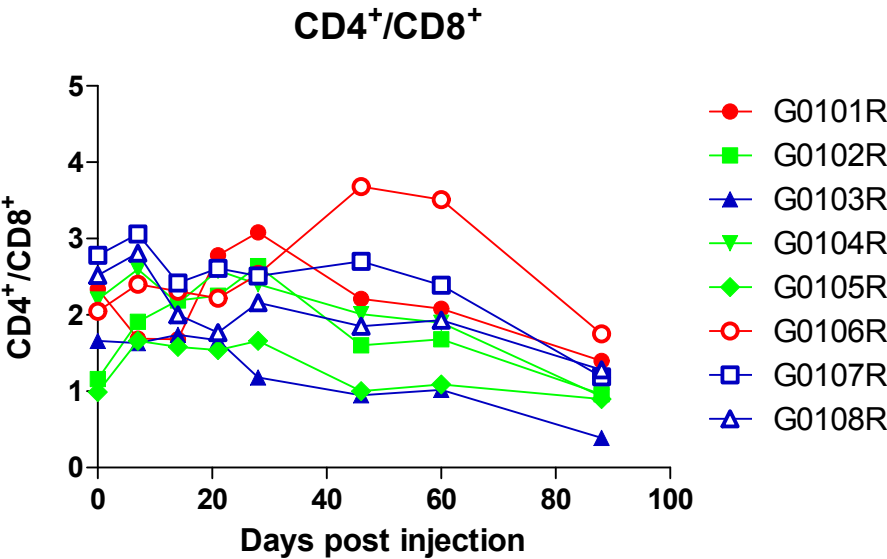


图 2 SIVmac239 小剂量多次直肠途径感染中国恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺比值
 Fig.2 The changes of CD4⁺/CD8⁺ ratio of T lymphocytes in Chinese-origin rhesus macaques infected intrarectally with repeated low dose of SIVmac239

3、SIVmac239 直肠感染恒河猴 CD4⁺和 CD8⁺细胞绝对数结果

感染猴外周血中 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数在 SIVmac239 感染前后变化幅度不大，只是变化趋势有所不同，G0101R 和 G0106R 猴 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数在感染第 88 天时略高于感染前的水平，其中以 G0101R 增加最显著，由感染前的 1.5×10^3 个/uL 增加到感染后第 88 天时的 2.1×10^3 个/uL。G0103R，G0107R 和 G0108R 猴感染前的 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数低于其他 5 只，波动在 600-800 个/uL 之间，到感染后第 14 天时，有所下降，随后有所恢复，到第 88 天时，CD4⁺T 淋巴细胞绝对数略低于感染前的水平。G0102R，G0104R 和 G0105R 猴的 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数也同样在感染后第 14 天出现下降，21 天时又有所增高，但与感染前相比，到感染后第 88 天时，这三只猴的 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数均略低于感染前的水平（图 3A）。

SIVmac239 感染后，G0101R 和 G0106R 猴 CD8⁺T 淋巴细胞绝对数的波动较为平稳，未

出现显著的降低或者升高的现象。G0103R, G0107R 和 G0108R 猴 CD8⁺T 淋巴细胞绝对数的变化也相对稳定, 在感染前其绝对数的水平也相对较低, 但是 G0103R 的绝对数在第 14 天下降之后明显增高, 可达 474 个/μL, 随后一直维持在此水平上波动。G0102R, G0104R 和 G0105R 猴的 CD8⁺T 淋巴细胞绝对数在感染后第 14 天时下降最为显著, 最低可达 340 个/μL, 随后有所恢复, 到第 88 天时, 其绝对数变化接近感染前的水平 (图 3B)。

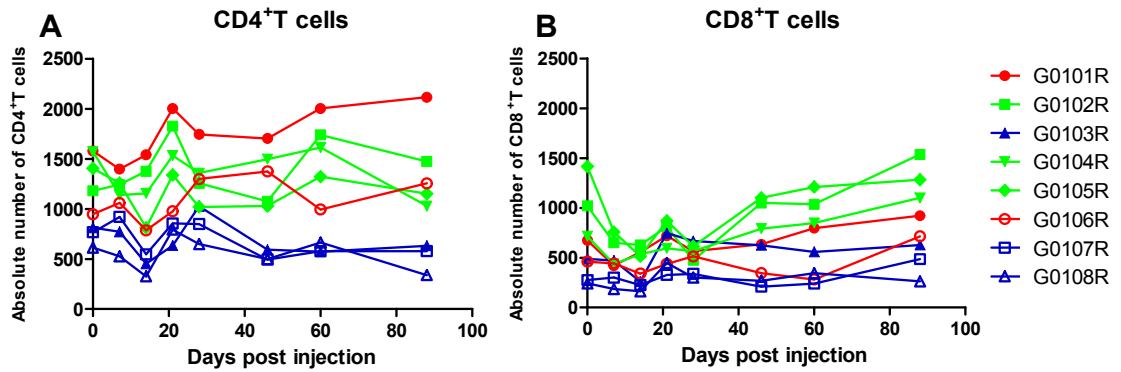


图 3 SIVmac239 小剂量多次直肠途径感染恒河猴外周血 CD4⁺和 CD8⁺细胞绝对数变化
Fig.3 The CD4⁺ cell counts and CD8⁺ cell counts (per l blood) in Chinese-origin rhesus macaques infecte intrarectally with repeated low dose of SIVmac239

五、模型发表文章

1. 刘浩, 刘强, 丛喆, 王卫, 乔红伟, 陈志伟, 魏强. 模拟 HIV 性传播特点的 SIVmac239 恒河猴直肠粘膜感染[J]. 中国实验动物学报. 2010, 18 (2): 100-104.
2. Chen S, Lai C, Wu X, Lu Y, Han D, Guo W, Fu L, Andrieu JM, Lu W. Variability of bio-clinical parameters in Chinese-origin Rhesus macaques infected with simian immunodeficiency virus: a nonhuman primate AIDS model. PLoS One. 2011;6(8):e23177.
3. 高锡强, 傅春燕, 薛婧, 王卫, 陈霆, 魏强. SIVmac239 病毒经不同途径感染恒河猴急性期CD4⁺ T细胞数量与其细胞表面CD95表达量的变化关系[J]. 中国比较医学杂志. 2012. 22(10): 14-18.
4. 王卫, 刘克剑, 吴芳新, 丛喆, 陈霆, 魏强. 猴免疫缺陷病毒(SIVmac239)多次直肠暴露对机体细胞免疫的影响. 中国比较医学杂志, 2014,24(8):1-6. Effect of repeated rectal exposure of low-dose simian immunodeficiency virus on the systemic cellular immunity in monkeys. CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE. 2014,24(8): 1-6.