

# 阴道途径 SIVmac251 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<sup>+</sup>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 SIVmac251 恒河猴感染模型制作方法

- 1、实验用病毒: 感染毒株为 SIVmac251 中国恒河猴细胞适应株, 病毒原液 TCID<sub>50</sub> 为  $2 \times 10^7$ /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，后肢抬高，暴露阴道口。用 2mL 预冷的无菌 PBS 清洗阴道。再将 1mL SIVmac251 病毒原液缓慢推入。实验猴保持此姿势 30min。
- 4、SIVmac251 阴道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、42、56 天采集 EDTA 抗凝血 4mL，分别测定血浆病毒载量、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值及血浆抗体测定。
- 5、SIVmac251 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、SIVmac251 阴道感染猴外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值测定：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<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值。
- 7、SIVmac251 阴道感染猴血浆抗体测定：免疫荧光法（IFA）检测感染猴血浆中的抗体水平。

#### 四、阴道途径 SIVmac251 恒河猴感染模型指标检测

##### 1、临床症状

实验猴在感染后 14 天出现食欲减退，并持续两周左右，体重有所下降，有浅表淋巴结肿大。

##### 2、SIVmac251 阴道感染恒河猴外周血病毒载量结果

S142 猴经 SIVmac251 阴道感染后 10d 检出病毒载量阳性，之后迅速上升，在 14d 达到高峰，峰值为  $6.48 \times 10^7$ ，随后迅速下降（图 1）。分别经三种不同途径（静脉途径、直肠途径和阴道途径）感染的实验猴在 SIVmac251 感染后血浆病毒载量的变化趋势基本一致，但病毒检出时间稍有不同，首先是静脉感染猴 S153 在 3d 检出阳性，其次为直肠感染猴 S172 在 7d 检出阳性，最后是阴道感染猴 S142 在 10d 检出阳性。

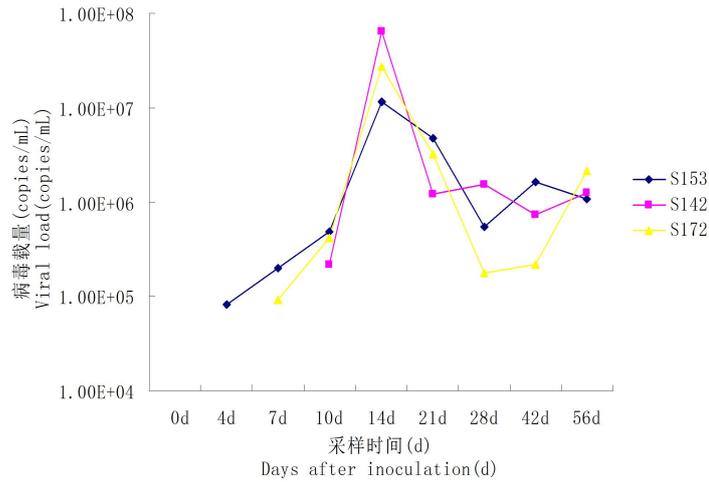


图 1 SIVmac251 不同途径感染恒河猴血浆病毒载量结果

Fig.1 Viral load in plasma of SIVmac251-inoculated rhesus monkeys by different route

### 3、SIVmac251 阴道感染恒河猴外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值结果

S142 猴经 SIVmac251 阴道感染后 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值持续下降到第 7d 开始回升，到第 10d 时出现一个反弹峰，随后 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值又继续下降，直到 28 天时下降到最低点，发生比例倒置。在急性期，S142 猴的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值一直在 1 以下波动。（图 2）。三只不同途径感染的实验猴 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>变化趋势基本保持一致，S172（直肠感染猴）和 S142（阴道感染猴）倒置的比 S153（静脉感染猴）严重。

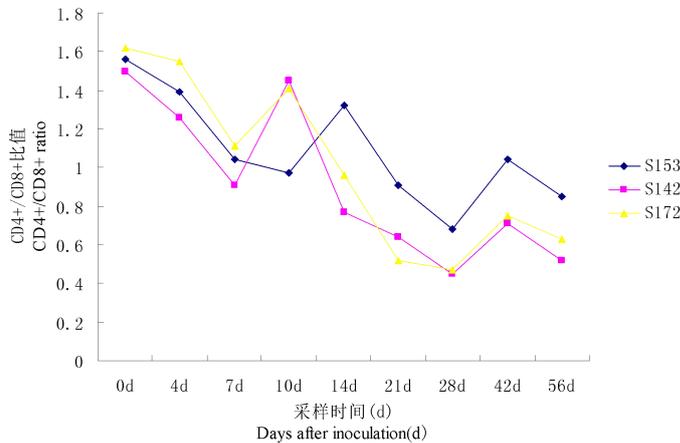


图 2 SIVmac251 不同途径感染恒河猴 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值

Fig.2 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio of SIVmac251-inoculated rhesus by different route

### 4、SIVmac251 阴道感染恒河猴血浆抗体检测结果

S142 猴经 SIVmac251 阴道感染后在第 14d 时血浆抗体均转为阳性，在 21d 时血浆抗体滴度缓慢上升，到 42d 时开始急剧上升，直到第 56d，血浆抗体最高到 1:640（图 3）。静脉感染猴 S153 在第 10d 时最早检出阳性，随后抗体滴度平缓上升，直到第 56d；直肠感染猴

S172 在第 14d 时血浆抗体均转为阳性，在 21d 时 S172 血浆抗体滴度迅速上升，42d 时 S172 开始急剧上升，直到第 56d，S172 最高到 1:1280。

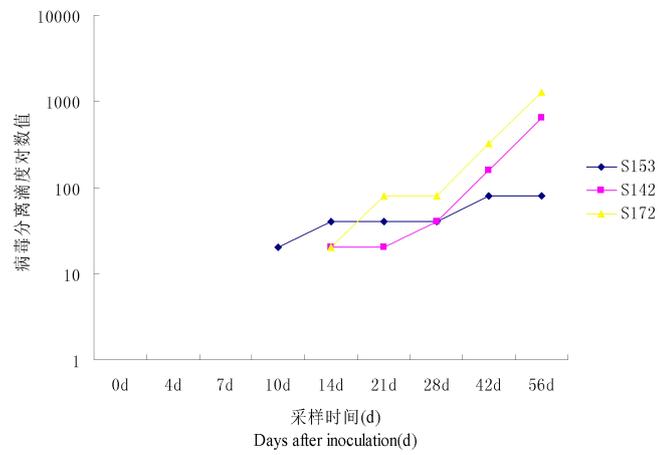


图 3 SIVmac251 不同途径感染恒河猴血浆抗体检测结果

Fig.3 The result of antibody in plasma after SIVmac251 inoculate rhesus by different route

#### 五、模型发表文章

1. 冯育芳,王卫,许琰,等.SIVmac251 不同途径感染恒河猴急性期实验研究[J].中国比较医学杂志,2007,17(2): 80-83.