

直肠途径 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⁺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 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, 中国恒河猴 PBMCs 滴定病毒原液 TCID₅₀ 滴度为 5×10^4 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：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 10000 TCID₅₀ 的 SIVmac251 病毒液 2mL 注入肛窦处，实验猴保持此姿势 30min。
- 4、SIVmac251 直肠感染猴样品采集和指标测定：在感染前和感染后 3、7、10、14、21、28、35、42、56、70、84 天采集 EDTA 抗凝血 4mL，分别测定血常规、血浆病毒载量、CD4⁺/CD8⁺、CD4⁺和 CD8⁺细胞绝对数。
- 5、SIVmac251 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、SIVmac251 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 SIVmac251 恒河猴感染模型指标检测

1、SIVmac251 直肠感染恒河猴血浆病毒载量结果

直肠途径接种 SIVmac251 病毒后，恒河猴血浆病毒载量均转为阳性，即在感染后病毒载量持续升高，14 天病毒载量达到高峰，约 10⁷copies/mL 左右，一直到 35 天均处于 10⁶-10⁷ copies/mL 的较高水平，随后载量下降并维持在 10⁴-10⁵ copies/mL 这一水平。

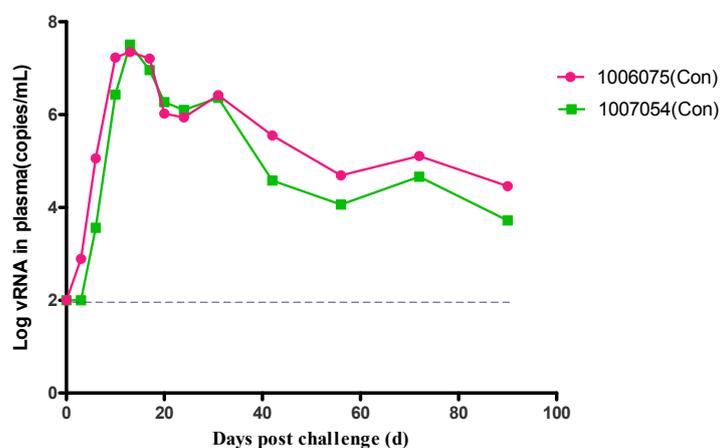


图 1 SIVmac251 直肠途径感染恒河猴血浆病毒载量结果

Fig.1 The viremia (viral RNA copies/ml plasma) in Chinese-origin rhesus macaques infected intrarectally with SIVmac251

2、SIVmac251 直肠感染恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺比值结果

感染猴 CD4⁺/CD8⁺的比例在感染后出现持续下降，出现倒置现象。1006075 和 1007054 分别于第 14 天、第 21 天将至最低点，数值分别为 0.39 和 0.5。随后 1007054 的 CD4⁺/CD8⁺的比例回升至 1，此后一直在 0.9 上下波动；而 1006075 回升至 1，后又降至 0.5，此后一直

维持在该水平。

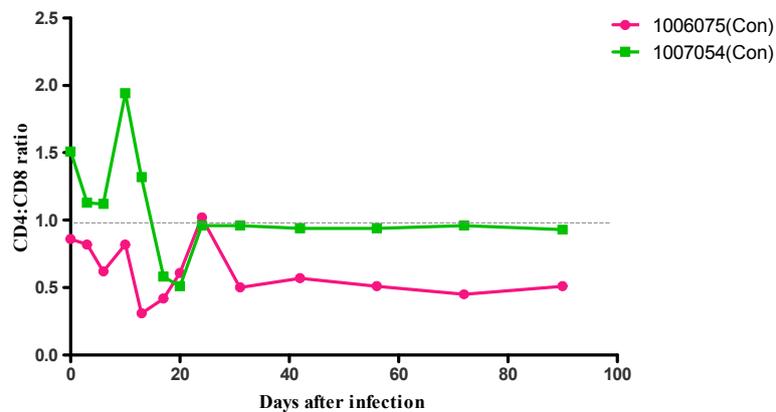


图 2 SIVmac251 直肠途径感染恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺比值

Fig.2 The changes of CD4⁺/CD8⁺ ratio of T lymphocytes in Chinese-origin rhesus macaques infected intrarectally with SIVmac251

3、SIVmac251 直肠感染恒河猴 CD4⁺和 CD8⁺细胞绝对数结果

两只恒河猴 CD4⁺细胞绝对数在 SIVmac251 感染后发生应激性增高, 然后出现明显的大幅下降, 随后又在短期内迅速反弹, 并最终在 40 天前达到相对稳定的状态。外周血中 CD8⁺细胞变化不尽相同, 经过急性期的剧烈震荡后, 1007054 猴在感染 28 天后水平基本稳定, 1006075 猴在感染 28 天后 CD8⁺T 细胞数量持续升高。

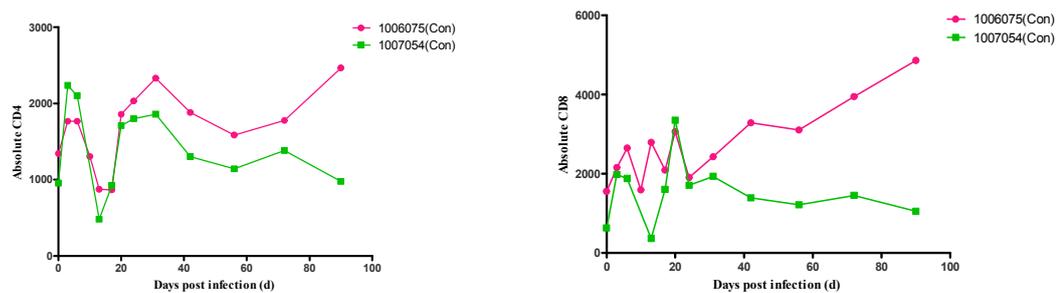


图 3 SIVmac251 直肠途径感染恒河猴外周血 CD4⁺ 和 CD8⁺细胞绝对数变化

Fig.3 The CD4⁺ cell counts and CD8⁺ cell counts (per l blood) in Chinese-origin rhesus macaques infected intrarectally with SIVmac251

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.