

静脉途径 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 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 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：将 1 mL 含有 50 TCID₅₀ 的 SIVmac251 病毒经后肢静脉接种恒河猴。
- 4、SIVmac251 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、84、112、140、168、196、231、259、287 天采集 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、SIVmac251 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、SIVmac251 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 SIVmac251 恒河猴感染模型指标检测

1、SIVmac251 静脉感染恒河猴外周血病毒载量结果

8 只 SIVmac251 静脉感染恒河猴均在感染后 7d 检出病毒载量阳性，之后迅速上升，在感染后 14d 达到高峰，峰值在 10⁷ 至 10⁸copies/mL 之间，随后迅速下降（图 1）。SIVmac251 静脉感染后 42d 到 140d 感染猴的血浆载量比较稳定，1、2、3、4、9、11 六只感染猴血浆病毒载量维持在 10⁵ 至 10⁷copies/mL 之间；10 号猴血浆病毒载量下降至 10⁵copies/mL 以下；12 号猴血浆病毒载量一直维持在较高水平，即 10⁷copies/mL 以上。

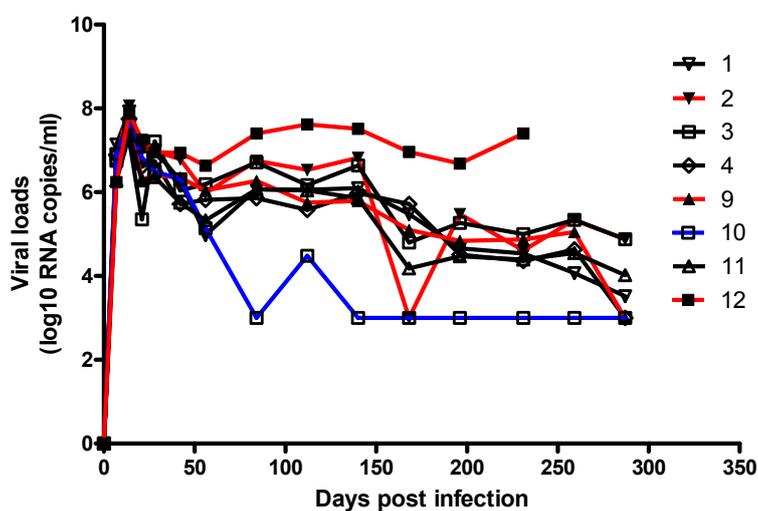


图 1 SIVmac251 静脉感染中国恒河猴外周血病毒载量结果

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

2、SIVmac251 静脉感染恒河猴 CD4⁺/CD8⁺比值结果

8 只感染猴 CD4⁺/CD8⁺的比例在 SIVmac251 静脉感染后持续下降，均于感染后 14d 出

现倒置。2、4、10、11、12 猴在感染后期一直维持在 1 以下的水平，其中，2、10、11 三只猴维持在 0.5 上下波动。1、3、9 三只感染猴在 SIVmac251 静脉感染后期 CD4⁺/CD8⁺ 比值有些许反弹，在 1.0 上下波动。（图 2）。

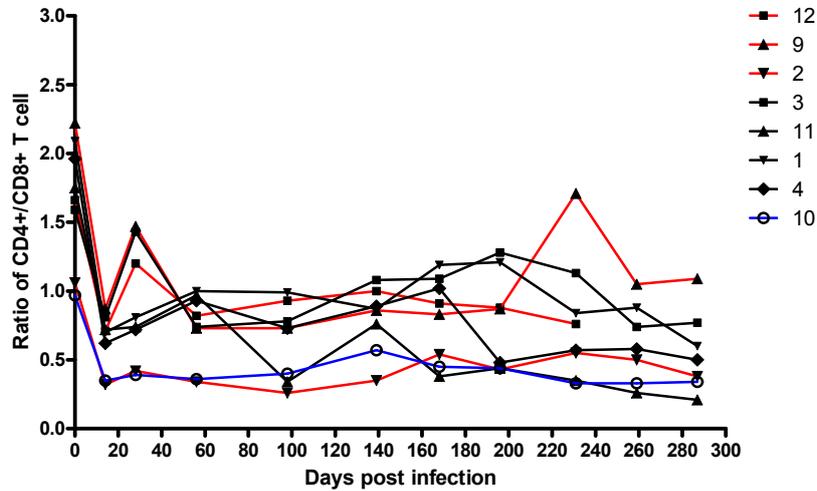


图 2 SIVmac251 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值

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

3、SIVmac251 静脉感染恒河猴 CD4⁺T 细胞绝对数

8 只感染猴 CD4⁺细胞绝对数在 SIVmac251 静脉感染后迅速下降，随后发生回弹，在感染后 56d 下降至最低，之后维持在稳定水平（图 3）。12 号猴的 CD4⁺细胞绝对数在感染后 231 天下降至 50 个/μL，出现艾滋病症状，继而死亡。4 号猴的 CD4⁺细胞绝对数在感染后 259 天下降至 100 个/μL 以下；3 号猴的 CD4⁺细胞绝对数一直在 800-1000 个/μL 上下浮动。

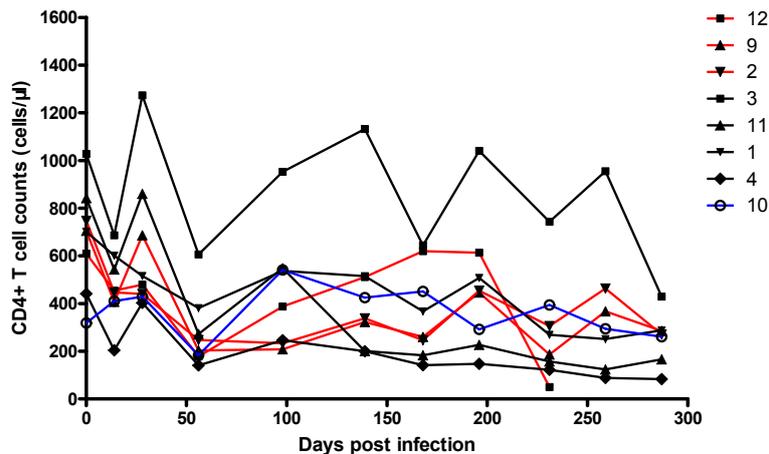


图 3 SIVmac251 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数

Fig.3 The CD4⁺ T cell counts (per l blood) in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously 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.
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. 薛婧,蒋虹,傅春燕,丛喆,陈霆,魏强.SIVmac251 感染增强恒河猴巨噬细胞对 galectin-3 诱导凋亡的敏感性。中国比较医学杂志,2013,23(10):67-71. SIVmac251-infection enhances the sensitivity of rhesus macaque macrophages to galectin-3-induced apoptosis. CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE. 2013,(10):67-71.
4. Cong Z, Xue J, Xiong J, Yao N, Wang W, Jiang H, Chen T, Chen Z, Wei Q, Qin C. Correlation of central memory CD4(+) T-Cell decrease in the peripheral blood with disease progression in SIVmac251-infected Chinese rhesus macaques. J Med Primatol. 2015 Aug;44(4):175-82. doi: 10.1111/jmp.12171. Epub 2015 May 6.