

基于 HAART 治疗的艾滋病潜伏感染恒河猴模型

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

国内外普遍采用的艾滋病治疗策略是美国华裔科学家何大一在 1996 年提出的高效抗逆转录病毒疗法(HAART), 该方法联合使用三种或三种以上的抗病毒药物抑制病毒的生命周期, 俗称“鸡尾酒”疗法。WHO 统计数据显示, 目前全球有 2169 万 HIV 感染者接受了该疗法, 占总感染人数的 59%。患者通过 HAART 治疗可以有效减少病毒的复制, 抵御病毒在体内传播, 将血浆中的病毒 RNA 抑制在检测水平以下, 从而延长患者生命, 降低发病率和死亡率。由于尚无有效的艾滋病疫苗问世, 抗病毒药物在预防 HIV 传播中亦起着极其重要的作用。目前国际上广泛接受 U=U (Undetectable = Untransmissible) 概念。同时, 药物也被用作高危人群的暴露前预防(PrEP)策略。然而, 目前的抗病毒药物不能从体内清除病毒, HIV 感染者需要长期甚至终生用药, 一旦停药, 体内的 HIV 将迅速反弹。

基于 HAART 治疗的艾滋病潜伏感染动物模型的成功建立, 可以深入研究该类药物在动物体内潜伏病毒的变化情况, 有助于了解病毒储存库的形成、组织分布及定量情况, 为潜伏库清除策略的研究奠定基础。该模型能更好地用于功能性治愈相关治疗策略的效果评价。

三、基于 HAART 治疗的艾滋病潜伏感染恒河猴模型制作方法

1、实验材料: SIVmac239 病毒; 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。

2、静脉途径 SIV 恒河猴感染模型制作方法:

先用宠物用电推剪推去猴上肢采血部位的猴毛, 左手抓住一侧后肢肘关节部位, 使后肢

皮下静脉怒张。用 75%酒精棉球消毒。右手拿吸取病毒液的注射器，针头沿静脉平行方向向向心端刺入血管，见回血后，左手放松，不再紧压，右手缓慢将病毒液推入。完毕后用干棉球压迫止血，将注射器拔出，弃在利器专用桶内。

3、给药方法：将建立稳定的 SIVmac239 慢性感染的恒河猴，经皮下注射 TFV/FTC/DTG，每天给药一次，连续给药 6 个月。

4、样本收集和检测：定期收集外周血样本，提取病毒 RNA 和病毒 DNA，测定血浆病毒载量、总病毒 DNA、ALU-PCR 和 Q-VOA。

四、基于 HAART 治疗的艾滋病潜伏感染恒河猴模型指标检测

1、血浆病毒载量变化情况：

SIV 成功感染恒河猴后，造成血浆病毒血症。通过给予高效抗逆转录病毒疗法（HAART），将血浆病毒载量抑制在低水平或基本检测不到的水平。停止 HAART 治疗，血浆病毒载量出现反弹。

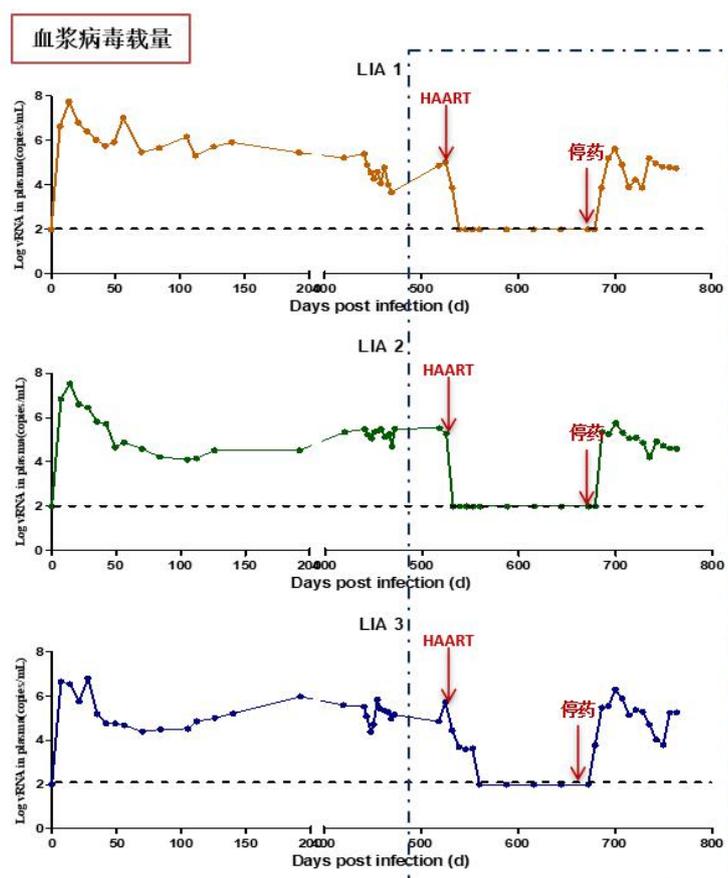


图 1 基于 HAART 治疗的艾滋病潜伏感染恒河猴模型的血浆病毒载量结果

2、免疫检测指标情况：

SIV 感染恒河猴在疾病慢性期血浆病毒载量高；经 HAART 治疗后，3 只猴的血浆

病毒载量均呈低水平复制。停药之后，血浆病毒载量出现反弹。SIV 感染恒河猴 LIA 2 和 LIA 3 的 CD4 细胞数明显上升。停药之后，CD4 细胞数会再次减少。SIV 感染恒河猴 LIA 2 和 LIA 3 的在进行药物治疗后，随着病毒载量的降低，CD4/CD8 比值升高。停药 CD4/CD8 比值降低。

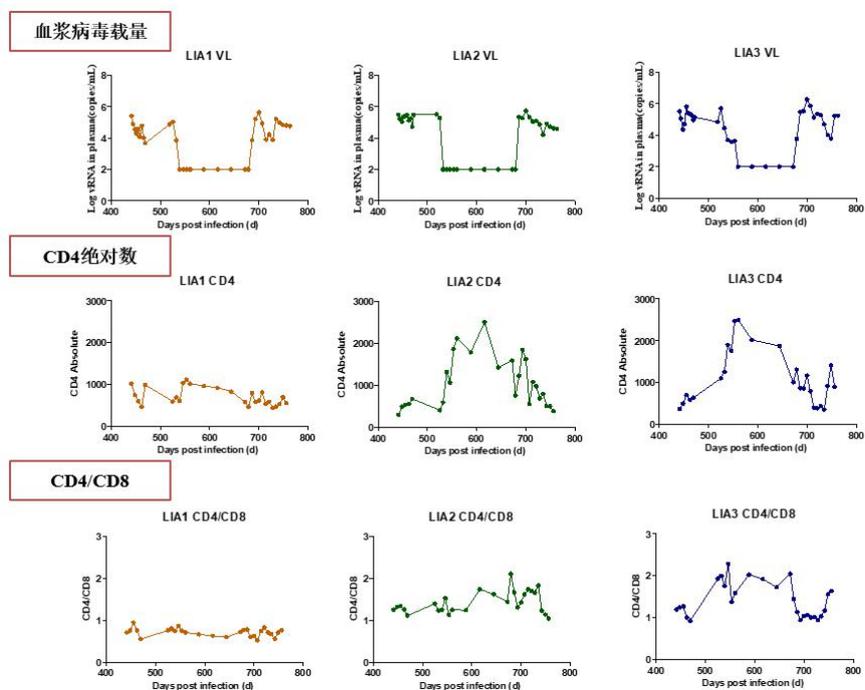


图 2 基于 HAART 治疗的艾滋病潜伏感染恒河猴模型的免疫检测指标结果

SIV 感染恒河猴在疾病慢性期 CD4 持续下降；经 HAART 治疗后，血浆病毒载量呈低水平复制，同时 CD4 细胞数明显上升。停药之后，CD4 细胞数会再次减少。有些个体在慢性感染阶段出现 CD4/CD8 比值倒置，在进行药物治疗后，随着病毒载量的降低，CD4/CD8 倒置现象缓解，停药后可能再次出现 CD4/CD8 倒置。有些个体在疾病不同阶段会腹泻、厌食、体重减轻等临床表现，其临床表现与药物治疗相关。

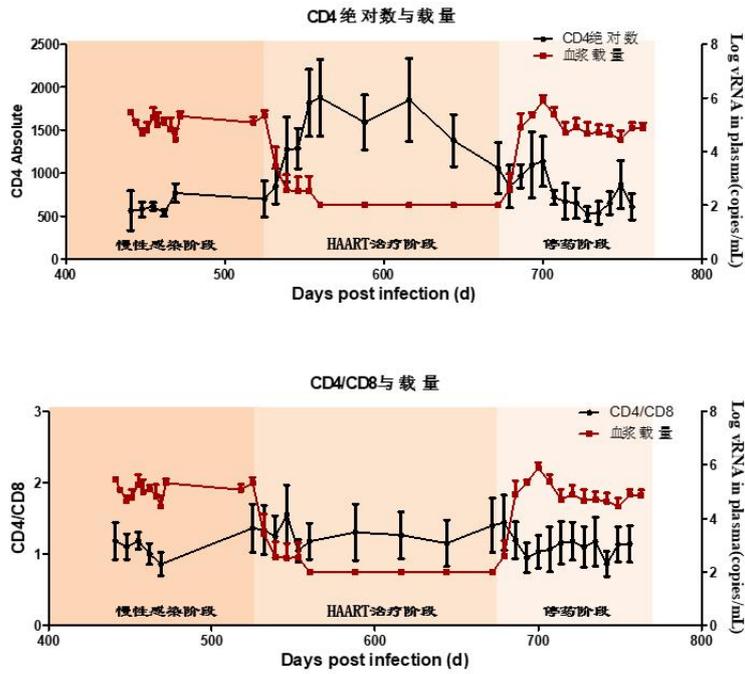


图3 基于 HAART 治疗的艾滋病潜伏感染恒河猴模型血浆病毒载量与免疫检测指标结果比对

3、发病过程比较：

建立的潜伏感染动物模型与人类有着相似的艾滋病发病过程。在感染艾滋病病毒后会经历急性期，大约为 50 天。攻毒 50 天之后便进入慢性感染阶段。经历了约 70 周的慢性感染阶段，给与感染猴 20 周 HAART 药物治疗。感染动物的发病过程也与是否进行药物治疗有关。不同疾病阶段的临床表现不同。

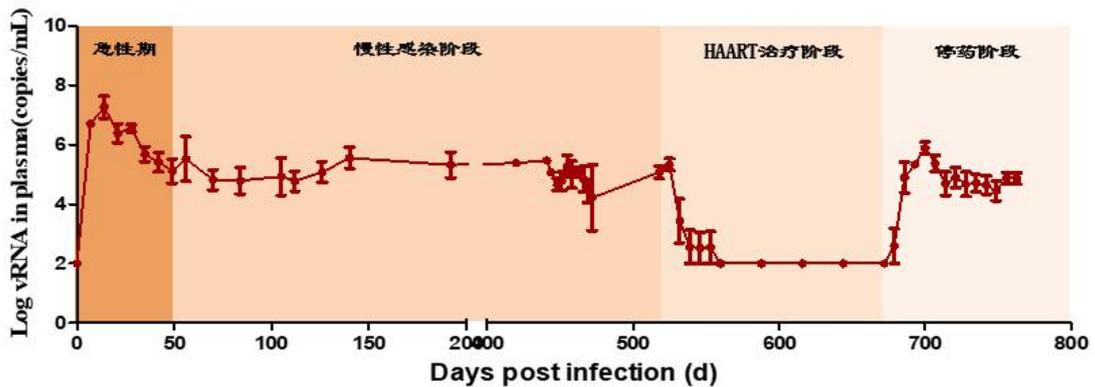


图4 基于 HAART 治疗的艾滋病潜伏感染恒河猴模型与临床发病过程模拟结果

	感染急性期	感染慢性阶段	药物治疗阶段	停药阶段
潜伏感染 恒河猴模型	<ul style="list-style-type: none"> 血浆病毒载量显著升高 CD4⁺T细胞数出现减少 体重出现下降 厌食 精神萎靡 	<ul style="list-style-type: none"> 病毒水平维持在稳定的状态 CD4持续下降，可能出现CD4/CD8倒置 厌食、体重明显下降 外周淋巴结肿大 腹泻 精神萎靡 其他并发症出现（如：结核） 	<ul style="list-style-type: none"> 血浆病毒载量降低到现有水平检测限以下 CD4细胞数持续回升CD4/CD8倒置现象缓解 腹泻症状缓解 精神状态恢复 	<ul style="list-style-type: none"> 血浆病毒载量反弹 CD4持续下降，可能再次出现CD4/CD8倒置 动物免疫力下降，会再次出现急性期症状 可能会合并感染其他疾病，甚至死亡
人类	<ul style="list-style-type: none"> 一般症状：发热，喉咙痛，淋巴结肿大，头痛/腰痛，肌肉和关节酸痛，倦怠，食欲减退伴有或不伴有体重减轻 胃肠道症状：恶心、呕吐、腹泻 神经学症状：脑膜炎，脑炎，周围神经系统病变，脊髓型颈椎病 皮肤病症状：红斑性斑丘疹，皮肤粘膜溃疡 持续几周或几天 	<ul style="list-style-type: none"> 在人类中该阶段又称为临床潜伏期 有活跃HIV复制但CD4⁺T细胞数下降 慢性HIV症状是可变的，主要取决于CD4计数和/或病毒载量 如果没有及时检测到HIV感染并采用ART治疗，则机会性感染和/或恶性肿瘤的发生是不可避免的。 一般约为10年 	<ul style="list-style-type: none"> 艾滋病患者采用“鸡尾酒疗法”，最大限度地抑制病毒的复制 被破坏的机体免疫功能部分甚至全部恢复 病程进展延缓，身体状态明显改善，持久低热消失，溃疡消失，精力恢复 	<ul style="list-style-type: none"> 停药后，潜伏的病毒会重新开始复制，病毒载量反弹 CD4细胞数下降，CD4/CD8可能出现倒置 患者免疫力下降，会再次出现急性期症状 一般会及时进行治疗

表 1 基于 HAART 治疗的艾滋病潜伏感染恒河猴模型与艾滋病患者临床表型对比

4、病毒 DNA 和整合病毒 DNA 变化情况：

药物治疗期间一直可以检测到病毒的 Total DNA。在治疗前，通过 Alu-PCR 定性检测，判断 3 只感染猴中有整合的病毒 DNA 存在。在治疗过程中，应用建立的 Alu-PCR 定性检测，发现 3 只感染猴体内一直存在整合的病毒 DNA。

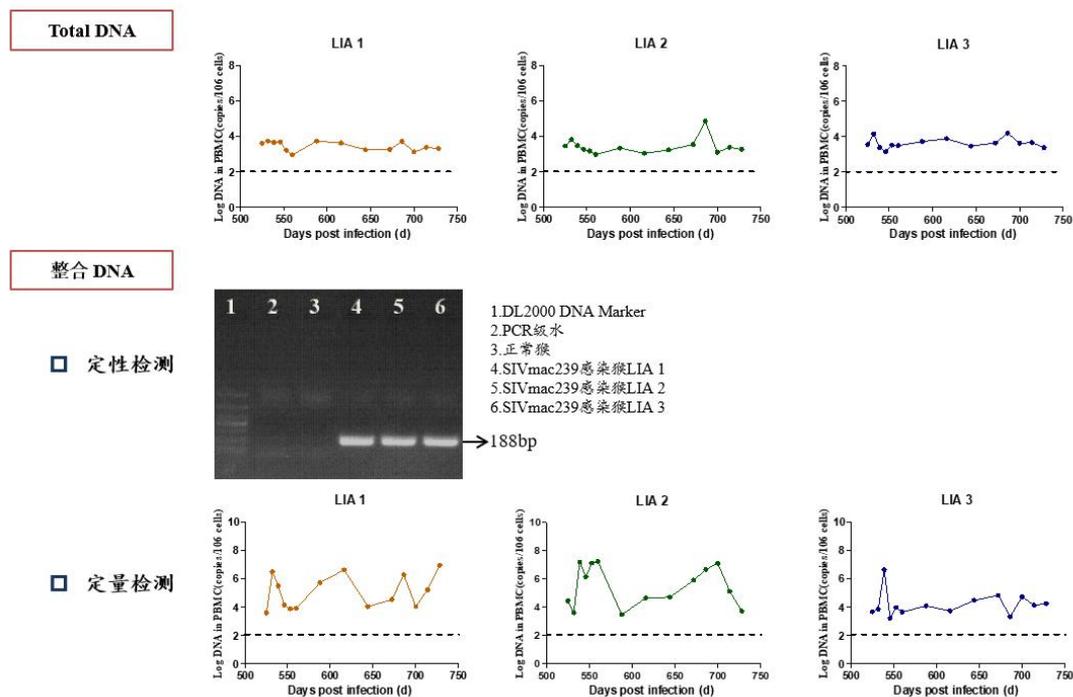


图 5 基于 HAART 治疗的艾滋病潜伏感染恒河猴模型总病毒 DNA 和整合性病毒 DNA 结果

5、具有复制潜能的定量病毒生长检测（Q-VOA）

感染猴在 HAART 药物治疗过程中，血浆病毒载量降低到现有水平的检测线下。通过 QVOA 检测，发现外周血的 Resting CD4⁺细胞中存在具有复制能力的病毒，这些病毒在药物治疗期间潜伏在宿主细胞中。

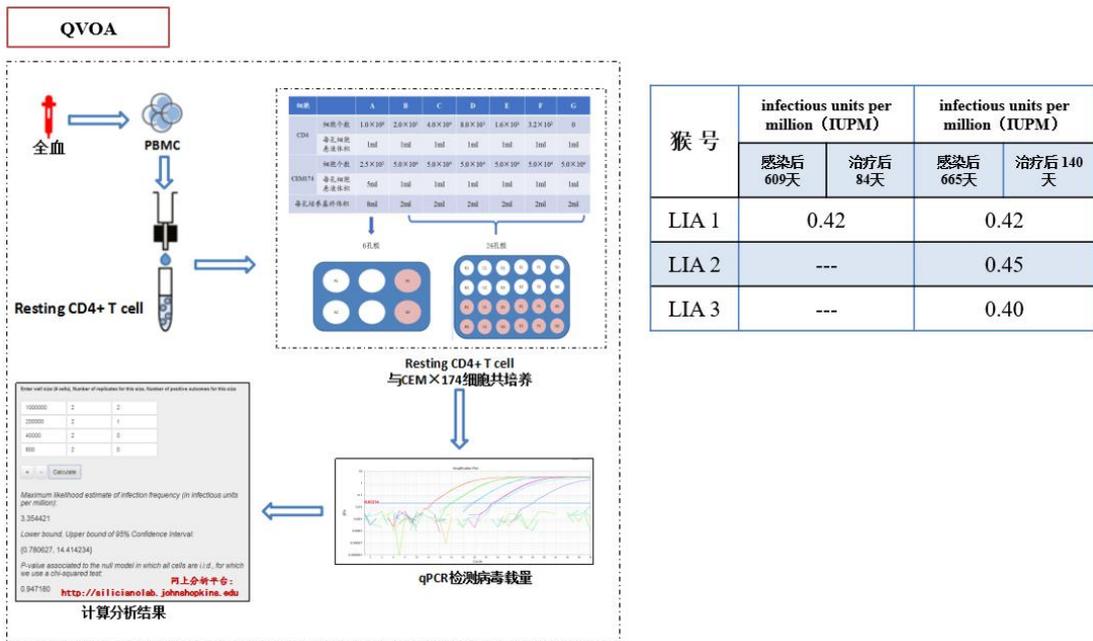


图 6 基于 HAART 治疗的艾滋病潜伏感染恒河猴模型 Q-VOA 结果

五、模型发表文章

无