

# 静脉途径 SHIVchn19p4 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

艾滋病发病机制研究、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。SIV/SAIDS(猴艾滋病)模型被广泛接受和应用, 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。然而, 由于 HIV 与 SIV 毕竟是两种不同的病毒, 它们在基因序列、包膜结构和抗原性之间存在一定差异, 使该模型的使用有一定的局限性。近年来, 人们应用分子生物学技术, 将 HIV-1 重要基因与 SIV 做成嵌合体病毒(SIV/HIV-1, 简称为 SHIV)感染恒河猴, 用以研究 HIV 不同基因的功能以及病毒与宿主的相互作用。

包含中国 HIV-1 CRF\_07BC 主要流行株 *env* 基因的 SHIVchn19 是由香港大学陈志伟教授构建的, 经猪尾猴和印度恒河猴体内系列传代分离出致病突变株 SHIVchn19p4, 其最重要的生物学特性就在于其 CCR5 受体特异性, 在艾滋病粘膜感染机制研究方面具有极其重要的作用。且由于它具有中国流行株的 *env* 基因, 相比其他包含中国主要流行株 B'/C 重组亚型的弱 SHIV 毒株, 如 SHIV-XJ02170、SHIVCN97001 等来说, 在针对中国流行株设计的 AIDS 疫苗的评价方面具有无可比拟的优势。

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 SHIVchn19p4 恒河猴感染模型制作方法

- 1、实验用病毒: 感染毒株为 SHIVchn19p4 中国恒河猴细胞适应株, TZM-bl 细胞检测病毒感染效价为  $1.5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/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：猴 G0601V 和 G0602V 经后肢静脉感染 1ml ( $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml) 病毒。
- 4、SHIVchn19p4 静脉感染猴样品采集和指标测定：在感染前和感染后 4、7、9、11、14、18、21、28、35、42、49、56、70、84 及 120d 采集猴静脉血 3ml (EDTA 抗凝)，用于外周血病毒载量、CD4<sup>+</sup>细胞绝对数及总结合抗体滴度测定。
- 5、SHIVchn19p4 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、SHIVchn19p4 静脉感染猴外周血 CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值，并根据血常规结果，计算出 CD4<sup>+</sup>T 细胞绝对数。
- 7、SHIVchn19p4 静脉感染恒河猴外周血总结合抗体滴度检测：恒河猴血浆样品从 1: 2 开始 2 倍连续稀释后，用“人类免疫缺陷病毒抗体诊断试剂盒（酶联免疫法）”检测交叉性体液免疫反应，高于 Cut-off 值的最大血浆稀释度定义为 SHIV 特异性总结合抗体滴度。

#### 四、静脉途径 SHIVchn19p4 恒河猴感染模型指标检测

##### 1、SHIVchn19p4 静脉感染恒河猴外周血病毒载量结果

G0601V 猴和 G0602V 猴均在感染后 9d 检测出病毒载量约为  $10^5$ copies/mL，两只猴分别于 19d 和 16d 出现病毒载量高峰，峰值约为  $10^6$ copies/mL。G0601V 猴在感染后 40d 载量下降至最低，至感染后 84d 载量维持在  $10^4$ copies/ mL。G0602V 猴在感染后 33d-84 的载量维持在  $10^4$ copies/ mL (图 1)。

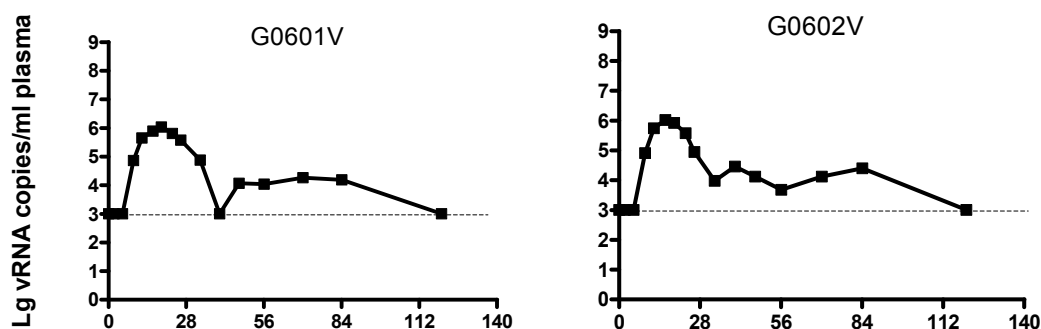


图 1 SHIVchn19p4 静脉感染中国恒河猴外周血病毒载量结果

Fig.1 The viremia (viral RNA copies/ml plasma) in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIVchn19p4

##### 2、SHIVchn19p4 静脉感染恒河猴 CD4<sup>+</sup>细胞绝对数结果

G0601V 猴 CD4<sup>+</sup> T 细胞数在 SHIVchn19p4 感染后围绕 1300 个/ul 水平波动；G0602V 猴 CD4<sup>+</sup>T 细胞数在 SHIVchn19p4 感染后围绕 1550 个/ul 水平上下波动 (图 2)。

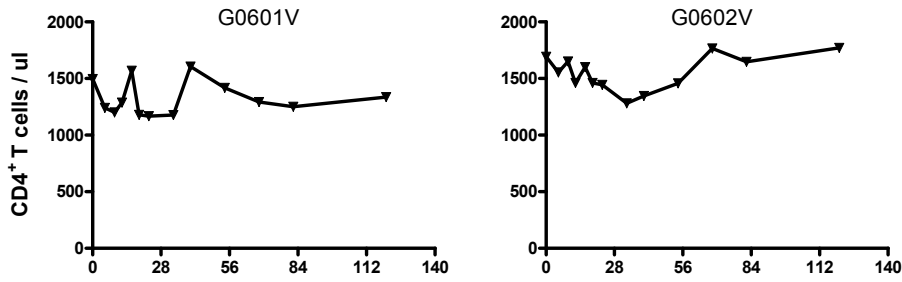


图 2 SHIVchn19p4 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞绝对数

Fig.2 The CD4<sup>+</sup> T cell counts (per 1 blood) in Chinese-original rhesus macaques infected intravenously with SHIVchn19p4

### 3、SHIVchn19p4 静脉感染恒河猴外周血总结合抗体滴度测定

G0601V 猴的抗体在感染后 19d 开始出现，于感染后 40d 达到峰值，随后维持在较高水平；G0602V 猴的抗体在感染后 12d 开始出现，随后抗体水平不断增高，直至感染后 84d 与 G0601V 猴的抗体水平较为接近（图 3）。

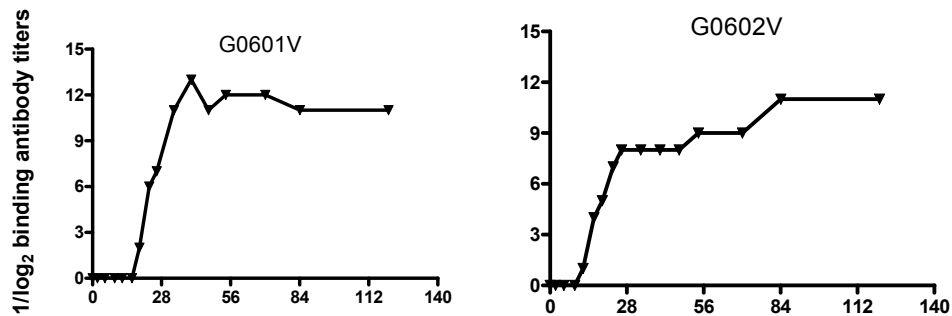


图 3 SHIVchn19p4 静脉感染中国恒河猴外周血总结合抗体滴度测定

Fig.3 The binding antibody in peripheral blood in Chinese-original rhesus macaques infected intravenously with SHIVchn19p4

## 五、模型发表文章

1. 丛喆，陶真，刘浩，姚南，金光，陈霆，魏强. SHIVchn19p7 中国恒河猴细胞适应株的制备和生物特性研究[J]. 医学动物防制. 2010. 26(8): 690-691.
2. 刘浩，刘强，丛喆，王卫，乔红伟，陈志伟，魏强。C 亚型 SHIV<sub>CHN19P4</sub> 强毒株在中国恒河猴体内的传代研究。中国比较医学杂志，2011，21（4）： 6-11。Serial Passages of Virus Clade C SHIV<sub>CHN19P4</sub> in Chinese Rhesus Macaque. CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE, 2011， 21（4）： 6-11.