

静脉途径 RT-SHIV/TC 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。

RT-SHIV病毒是由德国科学家Klaus Uberla.等于1995年构建出来, 其主要的构建策略是以SIVmac239为主要的框架, 将HIV_{HBc2}中的RT基因替换进去, 构建出包含有HIV-1 RT基因的SHIV, 美国科学家Kelly Soderberg.通过细胞学实验发现5'LTR的tRNA-Lys3 PBS区中碱基T到C的突变能够增强病毒的感染能力, 通过定点突变改造出感染能力更强的RT-SHIV/TC, 本模型使用的病毒即为该种, 是由美国NIH申请而来。

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 RT-SHIV/TC 恒河猴感染模型制作方法

- 1、实验用病毒: 感染毒株为RT-SHIV/TC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：用 200 TCID₅₀ 的 RT-SHIV/TC 经后肢静脉感染恒河猴。
- 4、RT-SHIV/TC 静脉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、35、42、50、66、84 及 98d 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、RT-SHIV/TC 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、RT-SHIV/TC 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 RT-SHIV/TC 恒河猴感染模型指标检测

1、RT-SHIV/TC 静脉感染恒河猴外周血病毒载量结果

G1101V 和 G1102V 分别在感染后 10d, 14d 检测到病毒载量（图 1），最高峰值出现在 21d 和 17d，分别为 6.9×10^5 copies/mL 和 2.1×10^6 copies/mL，结果显示 RT-SHIV 能对中国恒河猴进行感染，而且出现典型的病毒血症。

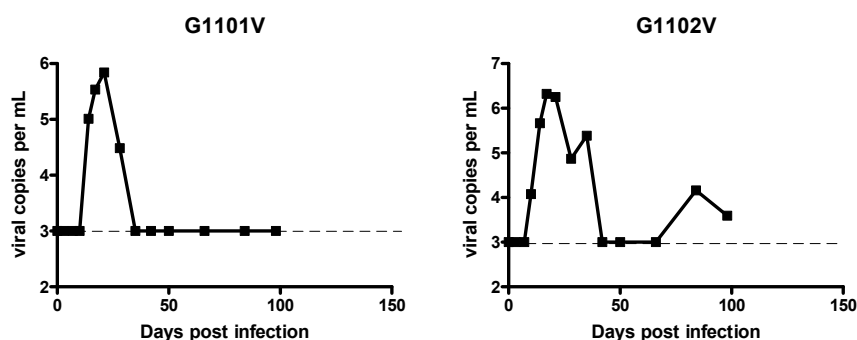


图 1 RT-SHIV/TC 静脉感染中国恒河猴外周血病毒载量结果

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

2、RT-SHIV/TC 静脉感染恒河猴 CD4⁺/CD8⁺比值结果

G1101V 的 CD4⁺/CD8⁺比值由 0d 基本值 1.83 持续波动上升，上升的最高值为 232d 的 3.19，在感染的后续时间中均未有 CD4⁺/CD8⁺比值低于 0d 的初始值。G1102V 的 CD4⁺/CD8⁺比值在 0d 基本值为 2.07，在感染的整个期间 CD4⁺/CD8⁺比值发生缓慢的下降（图 2）。

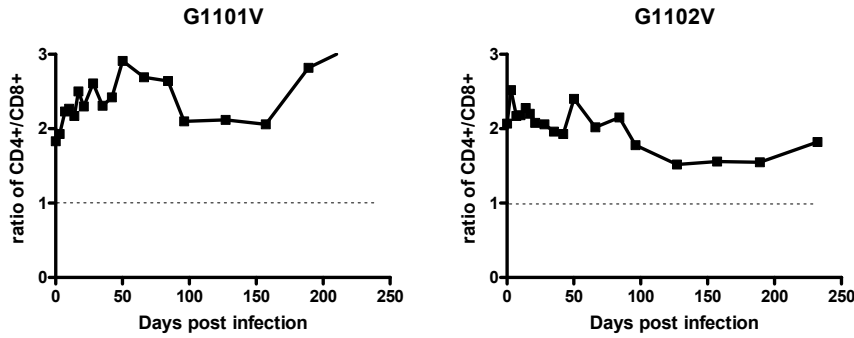


图 2 RT-SHIV/TC 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值

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

3、RT-SHIV/TC 静脉感染恒河猴 CD4⁺细胞绝对数结果

G1101V 的 CD4⁺ T 淋巴细胞绝对数在 0d 基本值 1973 个/ μ L 左右波动，最低值出现在 50d，为 1598 个/ μ L。G1102V 的 CD4⁺ T 淋巴细胞绝对数的 0d 基本值为 1918 个/ μ L，在第 50d 出现了最低值为 929 个/ μ L（图 3）。

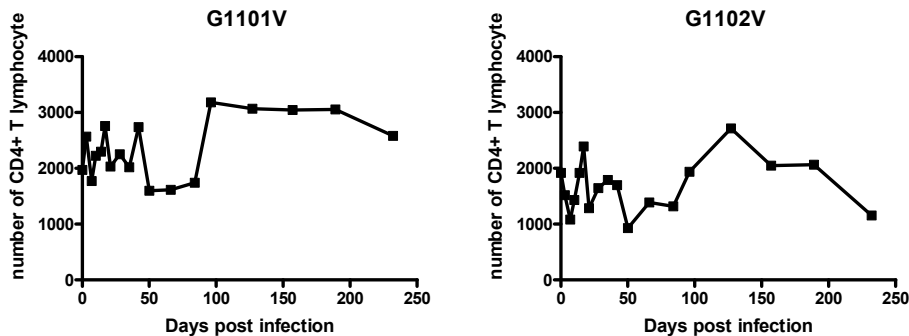


图 3 RT-SHIV/TC 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数

Fig.3 The CD4⁺ T cell counts (per 1 blood) in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with RT-SHIV/TC

五、模型发表文章

1. 姚南, 王卫, 丛喆, 陈霆, 金光, 陶真, 陈志伟, 魏强. RT-SHIV 感染中国恒河猴及体内传代. 中国比较医学杂志, 2011, 21 (4): 16-20. RT-SHIV Infected and Passaged in Chinese-Origin Rhesus Monkeys. CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE, 2011, 21 (4): 16-20.
2. Wang W, Yao N, Cong Z, Jiang H, Qin C, Wei Q. Prophylactic and therapeutic effect of AZT/3TC in RT-SHIV infected Chinese-origin rhesus macaques. AIDS Res Ther. 2014 Mar 4;11(1):12.