

# 直肠途径 SHIV<sub>SF162P3</sub> 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。

美国洛克菲勒大学的Aaron Diamond艾滋病研究中心Cecelia教授以SIV<sub>mac239</sub>为骨架替换HIV-1<sub>SF162</sub>(R5,MT/NSI)的*env*, *tat*, *rev*, *vpu*等基因构建了表达HIV-1 B亚型*env*的SHIV<sub>SF162PC</sub>, 经恒河猴体内传代得到SHIV<sub>SF162p3</sub>。它具有高度复制能力、CCR5受体嗜性, 并且能经粘膜传播, 这些特性使它在研究HIV感染和发病机制及评价AIDS候选疫苗的功效方面具有重要的现实意义。

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 SHIV<sub>SF162p3</sub> 恒河猴感染模型制作方法

- 1、实验用病毒: 感染毒株为SHIV<sub>SF162p3</sub>中国恒河猴细胞适应株, 中国恒河猴PBMCs滴定病毒原液TCID<sub>50</sub>滴度为 $1 \times 10^4$  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：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 SHIV<sub>SF162p3</sub> 中国恒河猴细胞适应株的稀释液注入肛窦处，实验猴保持此姿势 30min。
- 4、SHIV<sub>SF162p3</sub> 直肠感染猴样品采集和指标测定：感染采取小量多次的方法，共感染 21 次。前 3 次接种的病毒浓度为 1 TCID<sub>50</sub>/mL，然后 2 TCID<sub>50</sub>/mL 接种 3 次，10 TCID<sub>50</sub>/mL 接种 3 次，20 TCID<sub>50</sub>/mL 接种 3 次，最后 30 TCID<sub>50</sub>/mL 接种 5 次，每次接种间隔 4-7d。在每次感染前及 21 次感染结束后，采 EDTA 抗凝血 3mL，分别测定外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值及血浆病毒载量。
- 5、SHIV<sub>SF162p3</sub> 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、SHIV<sub>SF162p3</sub> 直肠感染猴外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 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<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。

#### 四、直肠途径 SHIV<sub>SF162p3</sub> 恒河猴感染模型指标检测

##### 1、SHIV<sub>SF162p3</sub> 直肠感染恒河猴外周血病毒载量结果

G0812R 与 G0821R 载量峰值最高，分别为为 10<sup>6</sup> 和 10<sup>6.5</sup> 拷贝/ml，而 G0813R、G0814R、G0815R、G0817R 和 G0819R 载量峰值较低，介于 10<sup>3</sup>~10<sup>5</sup> 拷贝/ml 之间（图 1）。

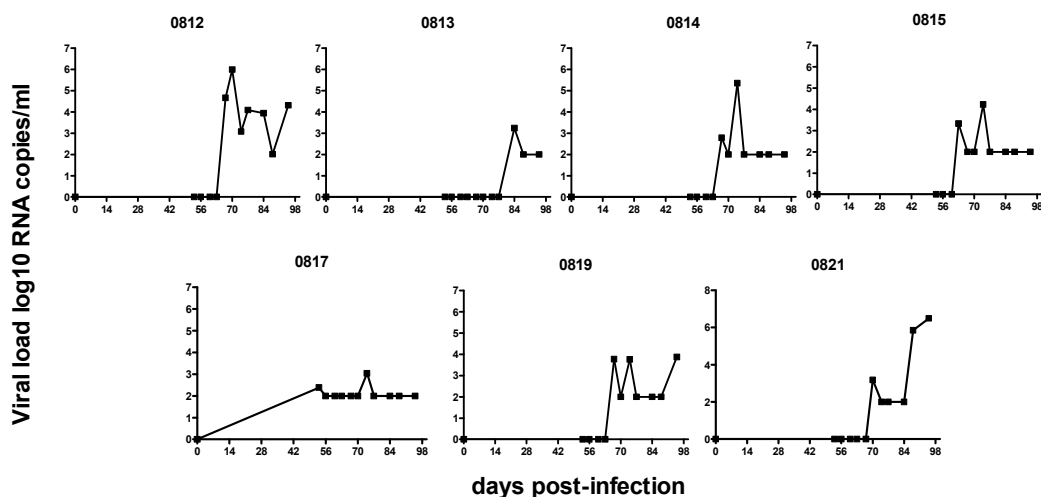


图 1 SHIV<sub>SF162p3</sub> 小剂量多次直肠途径感染恒河猴血浆病毒载量结果

Fig.1 The viremia (viral RNA copies/ml plasma) in Chinese-origin rhesus macaques infected intrarectally with repeated low dose of SHIV<sub>SF162p3</sub>

##### 2、SHIV<sub>SF162p3</sub> 直肠感染恒河猴外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值结果

7 只实验猴的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值在某一段时间内均有明显下降的趋势。G0813R 和 G0821R

两只猴的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值从感染初期的 2.0 左右，到感染 100 天后逐渐下降至 1.0 左右，其中，G0821R 猴在感染后 158 天出现倒置；G0819R 和 G0817R 两只猴的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值在感染后 100 天左右下降至 1.0 以下，出现倒置，随后发生反弹；G0812R、G0814R 和 G0815R 三只感染猴均在感染后 100 天，CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值下降至 1.0 以下，之后维持倒置现象（图 2）。

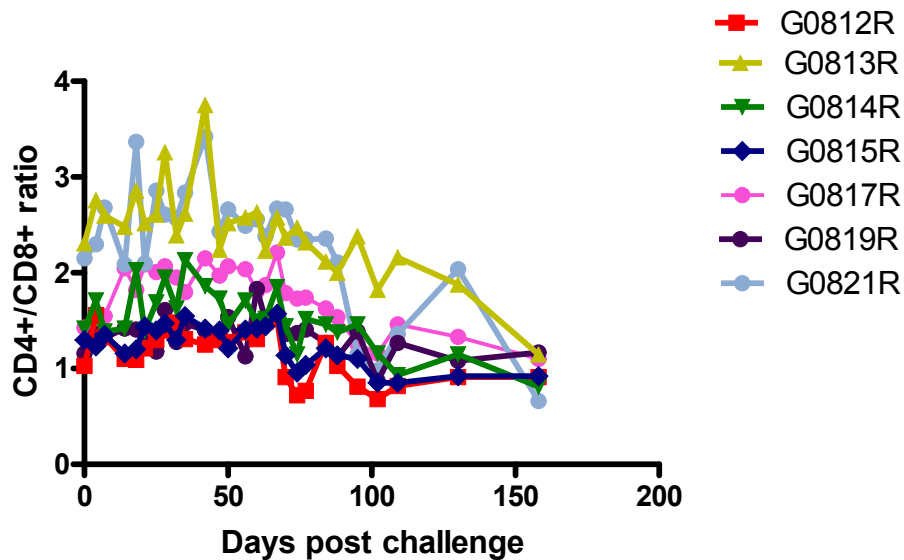


图 2 SHIV<sub>SF162p3</sub> 小剂量多次直肠途径感染恒河猴外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值

Fig.2 The changes of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio of T lymphocytes in Chinese-origin rhesus macaques infected intrarectally with repeated low dose of SHIV<sub>SF162p3</sub>

### 3、SHIV<sub>SF162p3</sub> 直肠感染恒河猴外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞绝对数结果

7 只实验猴的 CD4<sup>+</sup>细胞绝对数在感染 88 天内都基本保持稳定，在 1000-2000 个/ $\mu$ L 全血上下浮动，没有明显的升高或降低（图 3）。

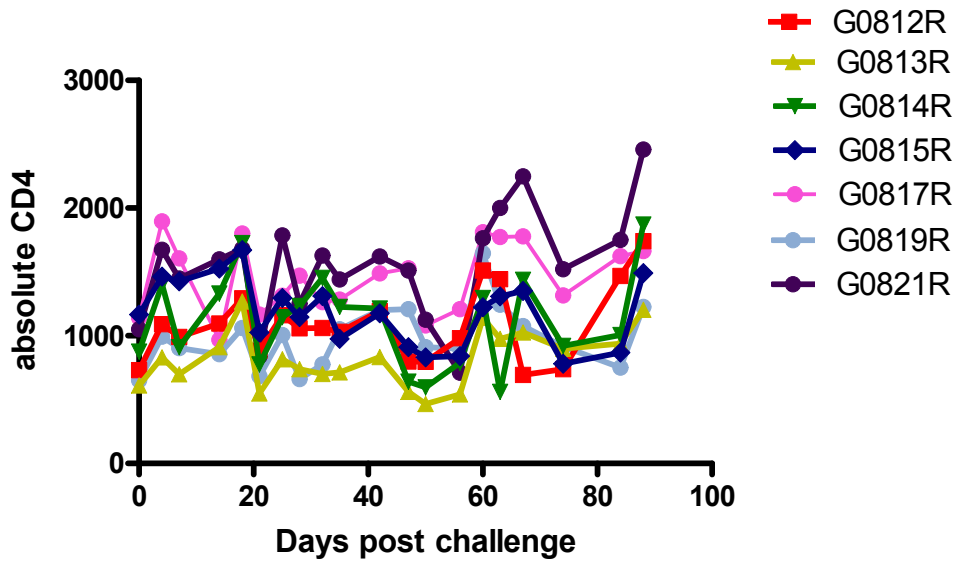


图 3 SHIV<sub>SF162p3</sub> 直肠途径感染恒河猴外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞绝对数的变化

Fig.3 The CD4<sup>+</sup> T cell counts in Chinese-original rhesus macaques infected intrarectally with repeated low dose of SHIV<sub>SF162p3</sub>

#### 五、模型发表文章

1. 熊竞, 丛喆, 王卫, 陈霆, 吴芳新, 刘克剑, 苏爱华, 鞠斌, 魏强. SHIVSF162P3 病毒感染急性期复制水平与慢性期 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群分布及频度相关性分析. 中国病毒病杂志, 2012,2 (5): 354-359. Experimental infection of SHIVSF162p3 in rhesus macaques: correlation analysis of the viral RNA levels in the acute phase and the distribution of CD4<sup>+</sup>T cell subsets in the chronic phase. Chin J Viral Dis, 2012,2 (5): 354-359.
2. Xue J, Cong Z, Xiong J, Wang W, Jiang H, Chen T, Wu F, Liu K, Su A, Ju B, Chen Z, Couto MA, Wei Q, Qin C. Repressive effect of primary virus replication on superinfection correlated with gut-derived central memory CD4(+) T cells in SHIV-infected Chinese rhesus macaques. PLoS One. 2013 Sep 2;8(9):e72295.