

静脉途径 SHIV-1157ipd3N4 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。

R. M. Ruprecht以SHIV-KB9为骨架构建了表达HIV-1 C亚型env的SHIV-1157i, 并经静脉途径感染印度恒河猴得到SHIV-1157ipd3N4。它所具有高度复制能力的、CCR5受体嗜性、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 SHIV-1157ipd3N4 恒河猴感染模型制作方法

- 1、实验用病毒: 感染毒株为SHIV-1157ipd3N4, 中国恒河猴PBMCs滴定TCID₅₀滴度为 5×10^2 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: 10只恒河猴随机分为6个剂量组, 由 10^{-1} 至 10^{-6} , 分别经后肢静脉感染稀释

好的病毒液 1mL。G1005V、G1006V、G1007V (10^{-1} , 50TCID₅₀), G1008V、G1009V、G1010V (10^{-2} , 5TCID₅₀), G1011V、G1012V、G1013V (10^{-3} , 0.5TCID₅₀), G1014V (10^{-4} , 0.05TCID₅₀)。

- 4、SHIV-1157ipd3N4 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、70 及 84d 采集 EDTA 抗凝血 4mL，分别测定血常规、血浆病毒载量、CD4⁺/CD8⁺、CD4⁺细胞绝对数和血浆结合抗体水平。
- 5、SHIV-1157ipd3N4 静脉感染猴血浆病毒载量的测定：TRIzol 法提取血浆中病毒 RNA，Quantitect SYBR Green RT-PCR Kit 测定血浆病毒 RNA 载量。
- 6、SHIV-1157ipd3N4 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。
- 7、SHIV-1157ipd3N4 静脉感染恒河猴外周血总结合抗体滴度检测：恒河猴血浆样品灭活后系列稀释，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 SHIV-1157ipd3N4 恒河猴感染模型指标检测

1、SHIV-1157ipd3N4 静脉感染恒河猴外周血病毒载量结果

50 TCID₅₀ 感染猴中 G1005V 和 G1007V 均在感染后 7d 就检出血浆病毒载量，G1006V 也在 14d 阳转。5 TCID₅₀ 感染猴 G1008V、G1009V、G1010V 的血浆病毒载量则均出现在感染后 14d。6 只感染猴高峰期的载量都在 10^5 - 10^7 copies/mL 之间，42d 后载量水平均有所下降，但随后反弹（图 1）。0.5TCID₅₀ 和 0.05TCID₅₀ 感染猴 G1011V、G1012V、G1013V、G1014V 在实验期间未出现血浆病毒载量。

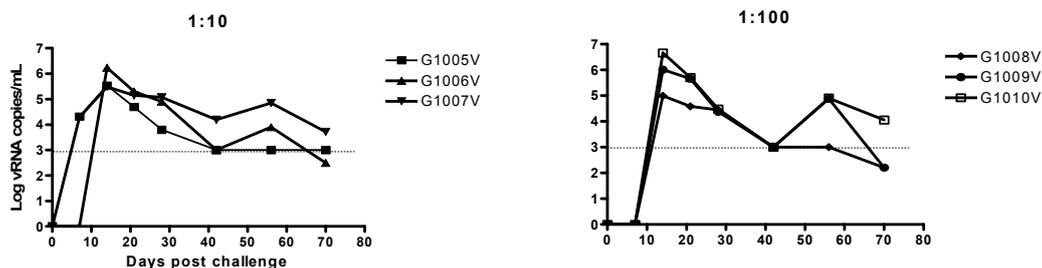


图 1 SHIV-1157ipd3N4 静脉感染中国恒河猴外周血病毒载量结果

Fig.1 The viremia (viral RNA copies/ml plasma) in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV-1157ipd3N4

2、SHIV-1157ipd3N4 静脉感染恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值结果

50 TCID₅₀ 感染猴 G1005V、G1006V、G1007V 在感染后 21d 均有下降, 随后反弹。5 TCID₅₀ 感染猴中除 G1010V 外, G1008V 和 G1010V 也在 21d 下降并反弹。G1009V 则不降反升, 但它在 56d 有一次大幅下降, 但也仍然在 1 以上 (图 2)。0.5TCID₅₀ 和 0.05TCID₅₀ 感染猴 G1011V、G1012V、G1013V、G1014V 在实验期间基本保持恒定。

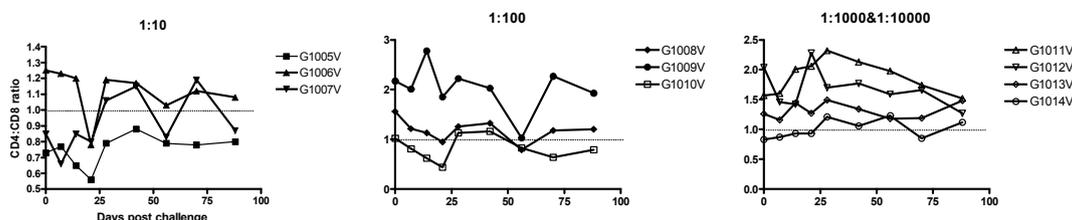


图 2 SHIV-1157ipd3N4 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值

Fig.2 The changes of CD4⁺/CD8⁺ ratio of T lymphocytes in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV-1157ipd3N4

3、SHIV-1157ipd3N4 静脉感染恒河猴外周血 CD4⁺T 细胞绝对数结果

各剂量组之间在 CD4⁺T 细胞绝对数上变化基本相同。感染猴中除了 50 TCID₅₀ 感染猴 G1007V 和 5 TCID₅₀ 感染猴 G1008V 在实验后期有升高外, 其它 4 只在整个实验期间基本保持水平 (图 3)。未感染的 4 只实验猴则整体呈现逐渐上升的趋势。

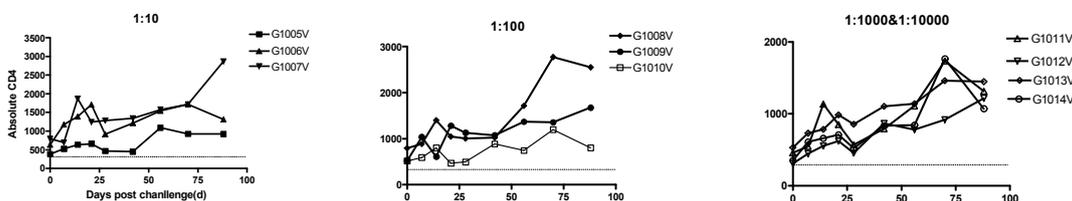


图 3 SHIV-1157ipd3N4 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数

Fig.3 The CD4⁺ T cell counts (per 1 blood) in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV-1157ipd3N4

4、SHIV-1157ipd3N4 静脉感染恒河猴外周血总结合抗体滴度测定

50 TCID₅₀ 感染猴 G1005V 和 G1007V 的抗体在感染后 21d 就出现了, 另一只感染猴 G1006V 也在 28d 阳转。与此同时, 5 TCID₅₀ 感染猴中只有 G1009V 在 21d 抗体阳性, 其它两只感染猴 G1008V 和 G1010V 抗体阳转时间为 42d。42d 以后, 6 只感染猴之间的抗体水平逐渐接近了 (图 4)。0.5TCID₅₀ 和 0.05TCID₅₀ 感染猴 G1011V、G1012V、G1013V、G1014V 在实验期间未检出抗体。

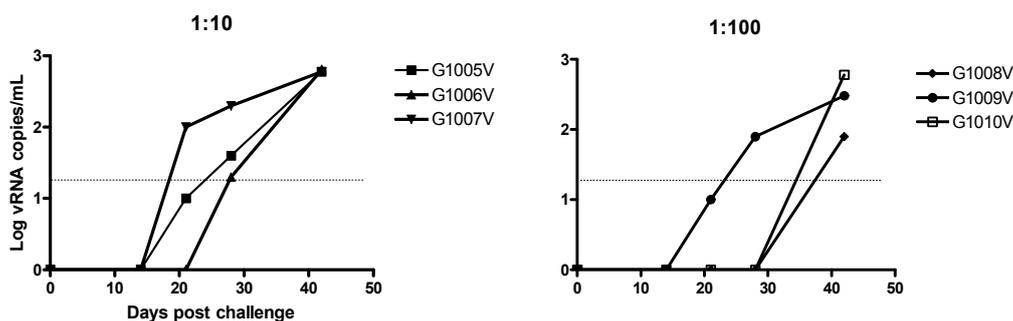


图 4 SHIV-1157ipd3N4 静脉感染中国恒河猴外周血总结合抗体滴度

Fig.4 The titers of Ab in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIV-1157ipd3N4

五、模型发表文章

1. 丛喆, 蒋虹, 金光, 陈霆, 王卫, 陶真, 姚南, 熊竞, 吴芳新, 陈志伟, 魏强. SHIV1157ipd3N4 中国恒河猴细胞适应株静脉感染中国恒河猴有效浓度的确定. 中国比较医学杂志, 2011, 21 (4): 12-15. Titration of a Stock by Intravenous Inoculation of Chinese-Origin Rhesus Macaques. CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE, 2011, 21 (4): 12-15.
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.
3. Wang W, Cong Z, Jiang H, Chen T, Jin G, Xiong J, Qin C, Wei Q. Comparison of viral burden and disease progression in Chinese-origin rhesus macaques infected with common experimentally applied chimeric virus: SHIV-1157ipd3N4, SHIV-162P3, or SHIV-KB9. J Med Primatol. 2014 Aug;43(4):247-57.