

# 阴道途径 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。为模拟异性间性传播的感染方式, 通过阴道粘膜上皮途径接种病毒, 病毒可能直接感染郎格汉斯细胞、上皮细胞等。在灵长类动物AIDS模型的研究中发现体内注入黄体酮可促进SIV/SHIV传播, 而雌激素则抑制SIV/SHIV传播, 可能与这些激素能影响阴道壁厚度或通过IL-2等影响CCR5和CXCR4受体表达有关。在合适的生理周期或使用一定量的黄体酮的情况下, 用导尿管将病毒缓慢注入猴阴道内, 可建立异性性传播动物模型。

## 三、阴道途径 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，后肢抬高，暴露阴道口。用 2mL 预冷的无菌 PBS 清洗阴道。再将稀释好的适当浓度的病毒液 1mL 缓慢推入。实验猴保持此姿势 30min。
- 4、SHIV<sub>SF162p3</sub> 阴道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 13 次。前 6 次使用 20TCID<sub>50</sub> 的 SHIV<sub>SF162p3</sub>,后 7 次使用 30TCID<sub>50</sub> 的 SHIV<sub>SF162p3</sub>, 间隔 4-7d, 进行阴道感染。在每次感染前及 13 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> 阴道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> 阴道感染猴外周血 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、阴道途径 SHIV<sub>SF162p3</sub> 恒河猴感染模型指标检测

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

6 只实验猴都先后出现了血浆病毒载量 (图 1)。1-1 感染后 27d 出现载量, 37d 达到高峰 ( $6.498 \times 10^7$ copies/mL), 57d 载量检测阴性消失, 但在 85d 载量再次出现, 直至 246d 载量一直都维持在  $10^5$ copies/mL 左右。1-2 病毒载量出现最早, 初次感染后的 23d 达到  $5.665 \times 10^5$ copies/mL, 27d 达到高峰 ( $2.1 \times 10^7$ copies/mL), 随后下降, 至 57d 检测呈阴性, 共持续了 4 周时间, 并且一直到第 246d 都持续阴性。1-3 和 1-4 的载量变化与 2 号相似, 只是载量出现时间稍晚, 1-3 的载量出现在 37d, 高峰期在 45d, 也达到了  $10^7$ copies/mL 的水平, 但只维持了 2 周的时间; 1-4 比 1-2 晚 4d 出现载量, 出现时载量也已达  $10^5$ copies/mL 的水平, 高峰期出现在 31d ( $4.72 \times 10^6$ copies/mL), 维持了 3 周左右的载量。不同的是, 它们分别在感染后 154d 和 203d 出现一过性小幅反弹, 载量水平只在  $10^3$ - $10^4$ copies/mL 之间。1-5 和 1-6 的载量出现最晚, 均出现在感染后 50d, 并且不连续, 没有明显的高峰, 始终维持在  $10^4$ - $10^6$ copies/mL 的水平。

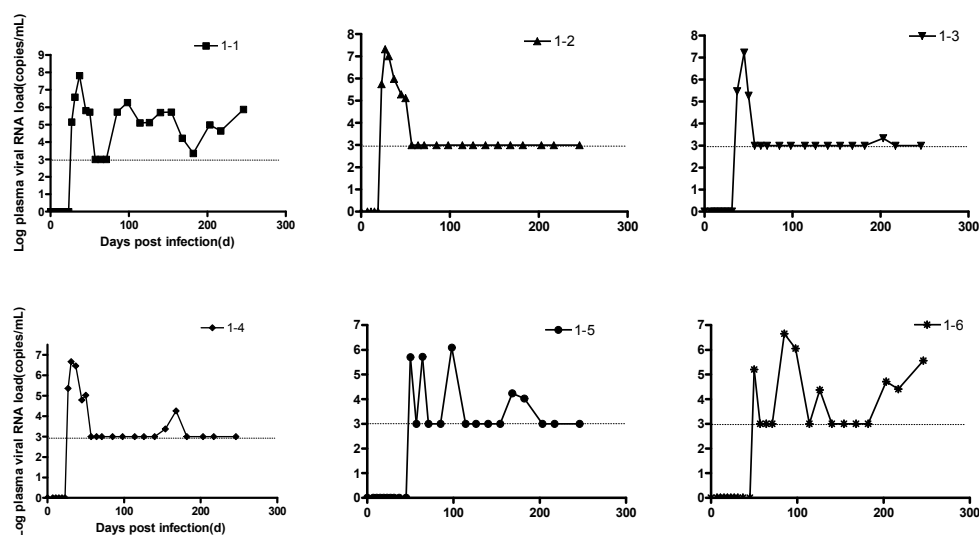


图 1 SHIV<sub>SF162p3</sub> 小剂量多次阴道途径感染恒河猴血浆病毒载量结果

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

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

6 只实验猴的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值在某一段时间内均有一个急剧下降的过程，总体有一个下降的趋势。1-1 在感染后 37d CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值迅速从感染后 31d 的 1.51 下降到 0.50，并且持续走低，到 300d 时，已降低到 0.35。1-2 和 1-4 总体没有太大的变化，但分别在感染后 31d 和 37d 有一个下降过程。1-2 由 27d 的 3.89 直降到 1.55，其后又迅速回升，始终徘徊在 3.0 附近；1-4 由 2.72 直降到 1.69，并维持在这个水平上，只在 182d 有一个小幅波动。1-3 和 1-5 变化基本相同，分别在感染后 45d 和 64d 降到最低，并且出现倒置，其中 1-5 甚至降到 0.5 以下，其后反弹并一直维持在 0.8-1.0 之间。1-6 与 1-3、1-5 趋势相同，变化幅度小，没有出现倒置，始终维持在 1.0 以上，最低值 1.02 出现在 85d（图 2）。

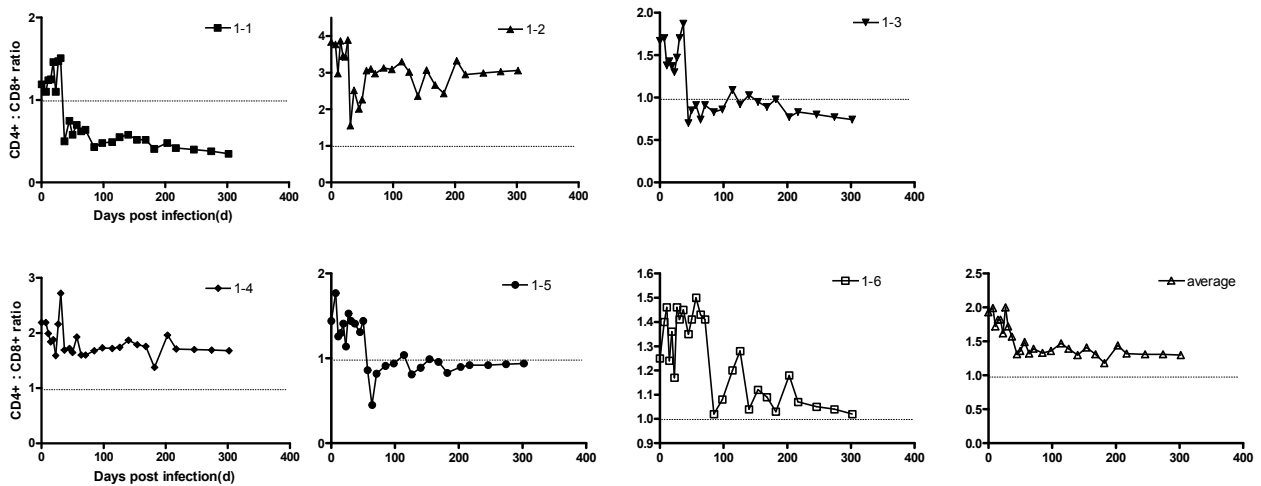


图 2 SHIV<sub>SF162p3</sub> 小剂量多次阴道途径感染恒河猴外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值

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

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

所有实验猴的 CD4<sup>+</sup>细胞绝对数在感染 50 天内都基本保持稳定，在 1000 个/μL 全血上下浮动，随后均有逐步下降，但下降幅度不大，最低值始终在 600 以上（具体数据未显示）。只有 1-1 下降幅度较大，到感染后 274d 时，已降到 293 个细胞/μL 猴血（图 3）。

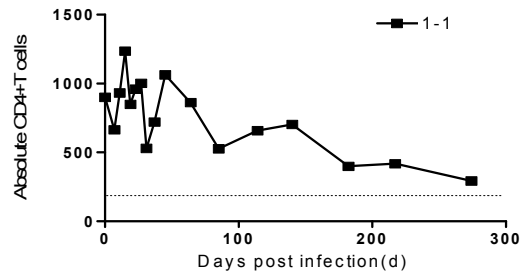


图 3 SHIV<sub>SF162p3</sub> 阴道途径感染恒河猴 1-1 外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞绝对数的变化

Fig.3 The CD4<sup>+</sup> T cell counts in Chinese-origin rhesus macaques 1-1 infected IVAG with repeated low dose of SHIV<sub>SF162p3</sub>

## 五、模型发表文章

1. 丛喆, 刘浩, 朵建英, 王卫, 蒋虹, 高虹, 杨志伟, Sylvain Fleury, 魏强, 秦川。B 亚型 SHIV<sub>SF162p3</sub> 中国恒河猴小剂量多次阴道粘膜感染。中国比较医学杂志, 2011, 21 (2): 44-48 。 Efficient Repeated Low-Dose Intravaginal Infection with SHIV<sub>SF162p3</sub> in Chinese-Origin Rhesus Macaques. CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE, 2011, 21 (2): 36-43.
2. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG, Mouz N, Amacker M, Chalifour A, Diomedede L, Devillier G, Cong Z, Wei Q, Gao H, Qin C, Yang GB, Zurbriggen R, Lopalco L, Fleury S. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. Immunity. 2011 Feb 25;34(2):269-80.