

静脉途径 SIVmac239 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、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。人们发现 HIV 以后, 用 HIV 感染过多种动物, 但由于种种原因, 结果并不理想。研究发现猴免疫缺陷病毒(SIV)感染实验用猴的模型效果比较理想, 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, 加之 HIV 和 SIV 有一定的基因同源性, 人和猴的生物学特性也较其他动物接近, 因而, SIV/SAIDS(猴艾滋病)模型被广泛接受和应用。

SIV 是猴获得性免疫缺陷综合征(Simian Immune Deficiency Syndrome, SAIDS)的主要致病病毒, 为典型的 C 型病毒粒子, 基因组长度大约为 9.2kb, 基因组成同 HIV-1 和 HIV-2 基本相同, 其完整的原病毒基因含有二个 LTR 以及同 HIV 类似的基因: *gag*、*pol*、*vif*、*tat*、*rev*、*env* 和 *nef*。所有基因在 SIV 的排列顺序同 HIV 完全一样。目前国内外对 SIV 的研究多集中在非克隆株 SIVmac251 和克隆株 SIVmac239 上, 因为这两个病毒株能在多种猕猴属动物身上引发致死性免疫缺陷综合征, 同时伴有 CD4⁺淋巴细胞下降, 继发机会性感染病毒性脑膜脑病。这些都与人类 AIDS 类似。

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 SIVmac239 恒河猴感染模型制作方法

- 1、实验用病毒: 感染毒株为 SIVmac239 中国恒河猴细胞适应株, 使用中国恒河猴 PBMCs 扩增制备, CEMx174 细胞滴定 TCID₅₀ 为 3×10^5 /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 SIVmac239 病毒原液 1:100 稀释至 1 mL，经后肢静脉接种恒河猴。
- 4、SIVmac239 静脉感染猴样品采集和指标测定：在感染前和感染后 10、17、24、28、42、56、84 天采集 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、SIVmac239 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、SIVmac239 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 SIVmac239 恒河猴感染模型指标检测

1、SIVmac239 静脉感染恒河猴外周血病毒载量结果

8 只 SIVmac239 静脉感染恒河猴血浆载量变化规律基本一致 (图 1)。Rid1、Rid3、Rid7、Rid9、Rid12、Rid13 在 SIVmac239 感染后 4d 就检出病毒载量阳性，Rid5、Rid10 两只感染猴在 SIVmac239 感染后 7d 检出病毒载量阳性。随后，8 只 SIVmac239 静脉感染恒河猴在感染后 11d-14d 达到高峰，峰值在 10⁶ 至 10⁷ copies/mL 之间，随后迅速下降。8 只感染猴在感染后 42d-210d 之间载量保持稳定水平，其中，Rid7、Rid13 两只感染猴在此期间血浆病毒载量维持在 10⁴ copies/mL 左右；Rid1、Rid3、Rid5、Rid9、Rid10、Rid12 六只感染猴在此期间血浆病毒载量仍保持在较高水平，约为 10⁵ 至 10⁶ copies/mL 之间。

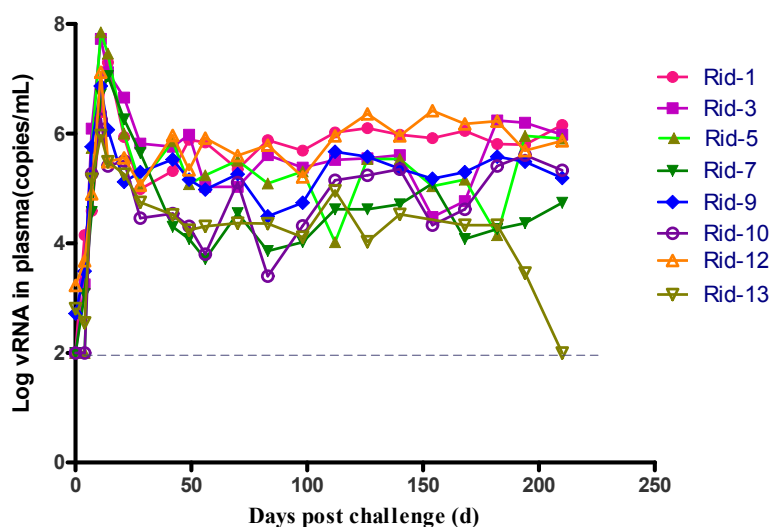


图 1 SIVmac239 静脉感染中国恒河猴外周血病毒载量结果

Fig.1 The viremia (viral RNA copies/ml plasma) in Chinese-original rhesus macaques infected intravenously with SIVmac239

2、SIVmac239 静脉感染恒河猴 CD4⁺/CD8⁺ 比值结果

8 只 SIVmac239 静脉感染恒河猴 CD4⁺/CD8⁺比值均在感染后 10d 之内发生应激性增高，随后迅速下降，维持在各自的稳定水平。Rid7 感染猴在感染后 112 天 CD4⁺/CD8⁺比值发生倒置，之后一直维持在 1.0 以下。其余 7 只感染猴均未出现 CD4⁺/CD8⁺比值倒置（图 2）。

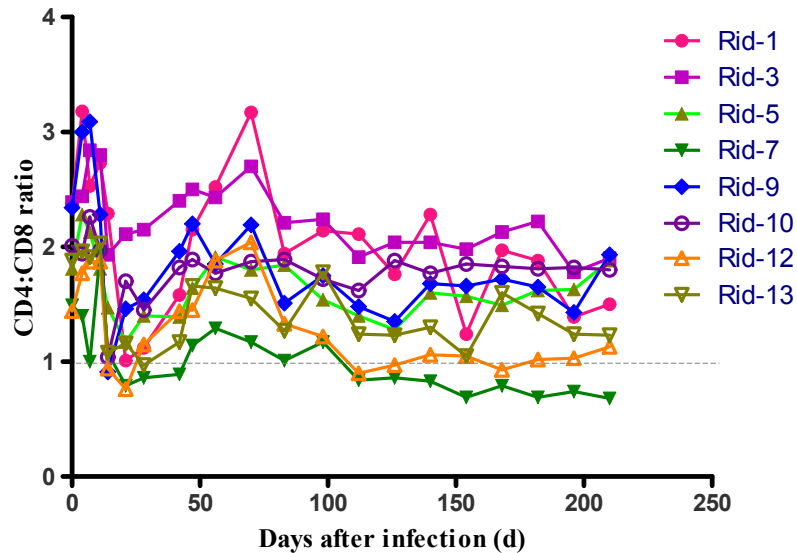


图 2 SIVmac239 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺T 淋巴细胞比值
 Fig.2 The changes of CD4⁺/CD8⁺ ratio of T lymphocytes in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SIVmac239

3、SIVmac239 静脉感染恒河猴 CD4⁺T 细胞绝对数

8 只 SIVmac239 静脉感染恒河猴后在感染后 CD4⁺T 细胞绝对数均迅速下降，至感染后 11d CD4⁺T 细胞绝对数下降至最低，随后迅速回弹，再缓慢下降，维持在各自稳定的水平。其中，Rid1 感染猴在感染 150d 后 CD4⁺T 细胞绝对数下降至 200 个/μL 左右，Rid7 感染猴在感染 154d 后 CD4⁺T 细胞绝对数下降至 100 个/μL 左右，两只感染猴的 CD4⁺T 细胞绝对数维持在较低水平（图 3）。

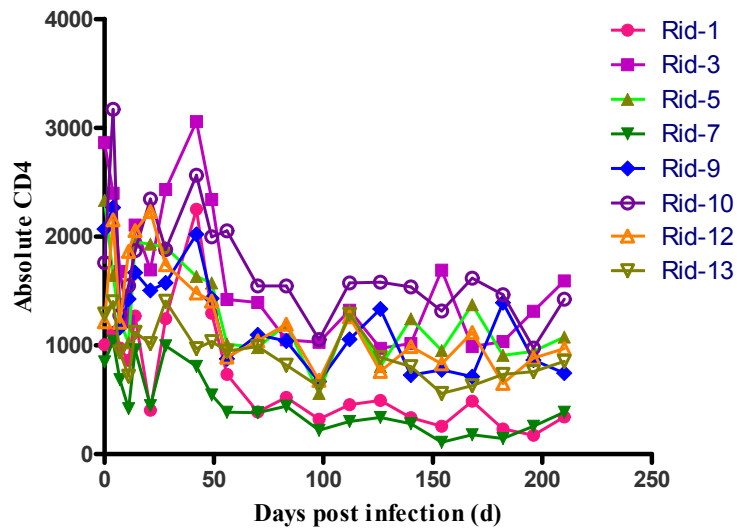


图 3 SIVmac239 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数
 Fig.3 The CD4⁺ T cell counts (per 1 blood) in Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SIVmac239

五、模型发表文章

1. Chen S, Lai C, Wu X, Lu Y, Han D, Guo W, Fu L, Andrieu JM, Lu W. Variability of bio-clinical parameters in Chinese-origin Rhesus macaques infected with simian immunodeficiency virus: a nonhuman primate AIDS model. PLoS One. 2011;6(8):e23177.
2. 高锡强, 傅春燕, 薛婧, 王卫, 陈霆, 魏强. SIVmac239 病毒经不同途径感染恒河猴急性期 CD4⁺ T 细胞数量与其细胞表面 CD95 表达量的变化关系[J]. 中国比较医学杂志. 2012. 22(10): 14-18.