



SHIV-KB9 感染中国恒河猴动物模型的建立

王卫¹, 刘强², 许琰¹, 冯育芳¹, 丛喆¹, 佟巍¹,
蒋虹¹, 杨贵波², 魏强¹, 秦川¹

- (1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021;
2. 中国性病艾滋病预防控制中心, 中国疾病与预防控制中心, 北京 100050)

【摘要】 目的 为了进一步确证 SHIV-KB9 感染中国恒河猴的病毒浓度范围, 测试动物对病毒的适应性, 明确该动物模型的可重复性。方法 实验前采集猴血清并进行血清学检查。选出 4 只无 SIV、STLV、SRV/D 和 B 病毒感染的恒河猴, 分别用 10 倍系列稀释的病毒液静脉感染实验猴, 使用流氏细胞术、血常规、病毒分离、DNA-PCR 和 RT-PCR 等方法确定实验猴是否被感染, 以及感染后恒河猴体内病毒复制和免疫细胞损伤情况。结果 实验猴的血浆病毒载量、病毒分离结果、CD4⁺/CD8⁺ 比值和 CD4⁺T 细胞数等证实 4.8×10^5 copies/mL 以上浓度的 SHIV-KB9 病毒液能成功感染中国恒河猴。结论 本研究进一步明确了 SHIV-KB9 感染中国恒河猴的有效病毒浓度范围, 确定了 SHIV-KB9 病毒感染中国恒河猴的病毒学、免疫学的测定指标, 成功的建立了 SHIV-KB9/中国恒河猴动物模型。

【关键词】 SHIV-KB9; 恒河猴; 艾滋病; 模型; 动物

【中图分类号】 R373 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)02-0001-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.02.01

Establishment of a Chinese-Origin Rhesus Macaque Model of SHIV-KB9 Virus Infection

WANG Wei¹, LIU Qiang², XU Yan¹, FENG Yu-fang¹, CONG Zhe¹, TONG Wei¹,
JIANG Hong¹, YANG Gui-bo², WEI Qiang¹, QIN Chuan¹

- (1. Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China;
2. National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Beijing 100050)

【Abstract】 Objective The aim of the present study was to further confirm the viral concentration of SHIV-KB9 virus for infection of Chinese rhesus monkeys, to test the animals' adaptability to the virus, to clarify the repeatability of the animal model, and try to establish a Chinese-origin rhesus macaque model of SHIV virus infection. **Methods** Four Chinese-origin rhesus macaques were used in this study. All the monkeys were screened by serological test to ensure that they were free from SIV, SRV and STLV infection. Then they were infected by i. v. injection of 10 × diluted viral series

[基金项目] 科技重大专项 - 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治, 项目号 2009ZX10004-402 和 2008ZX10001-402。

[作者简介] 王卫(1981 -), 男, 研究实习员, 从事实验动物病毒分子生物学研究工作。

[通讯作者] 秦川, 教授, 博士生导师, 研究方向: 病理生理学。E-mail: chuanqin@vip.sina.com。

separately. Finally to determine if the Chinese-origin rhesus macaques were infected by flow cytometry, blood routine examination, virus isolation and PCR. **Results** The results of all tests proved that only the virus concentration higher than of 4.8×10^5 copies/mL can infect the Chinese-origin rhesus macaques. **Conclusion** This results of this study further clarified the effective concentration of SHIV-KB9 virus for infection of Chinese rhesus monkeys, identified virological and immunological indicator of SHIV-KB9 infection of Chinese rhesus monkeys, and we have successfully established a Chinese rhesus monkeys model of SHIV-KB9 virus infection.

【Key words】 SHIV-KB9 virus; Chinese-origin rhesus macaques; AIDS; Model animal

目前, AIDS 的非人灵长类模型有 3 类: HIV-1/黑猩猩, SIV_{mac}/恒河猴和 SHIV/恒河猴模型^[1]。黑猩猩对 HIV 不十分敏感, SIV 与 HIV 的差异等因素都制约 HIV-1/黑猩猩和 SIV_{mac}/恒河猴两种模型的应用^[2-3], 因此以 SHIV 进行攻击, 建立的灵长类模型是目前 AIDS 研究常用的动物模型。由于中国恒河猴和印度恒河猴在遗传背景上的不同导致其在 SIV 等慢病毒感染中显现很不相同的病毒血症和疾病过程^[4-5]。在前期的研究工作中, 我们使用 SHIV-KB9 感染中国恒河猴, 并得到了感染病毒的有效浓度范围、疾病进程及所引发的病毒免疫等方面^[6]数据。但建立 SHIV-KB9/中国恒河猴动物模型需要更多的资料, 因此, 为了进一步确证 SHIV-KB9 感染中国恒河猴的病毒浓度范围, 测试动物对病毒的适应性, 明确动物模型的可重复性, 我们接着进行第二批动物实验, 以期获得一个稳定而明确的 SHIV-KB9 病毒感染浓度范围, 建立 SHIV/中国恒河猴动物模型, 为今后应用此模型研究艾滋病的发病机制、传播、感染免疫和测试抗病毒药物或疫苗奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

恒河猴 4 只, 由中国医学科学院医学生物学研究所提供, 用商品化膨化饲料饲养。体重 3 ~ 5 kg。实验前经体检无异常, 经血清学间接免疫荧光抗体检查法 (IFA) 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。所有动物实验在 ABSL-3 实验室中进行。

1.2 SHIV-KB9 毒株

SHIV-KB9 毒株由中国疾病与预防控制中心性病艾滋病预防控制中心杨贵波教授提供, RT-PCR 测定病毒拷贝数为 4.8×10^8 copies/mL。

1.3 分组设计及感染方法

4 只恒河猴编号分别为 A0423、A0424、A0425

和 A0426。病毒原液依次用无血清 1640 培养液做 10 倍系列稀释。经后肢静脉感染, 每只猴注射 1 mL 稀释好的病毒液。A0423-A0426 分别注射 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 病毒液 1 mL。持续测定 8 个月。

1.4 采样

在感染前和感染后 3、7、10、14、17、21、28、35、42、49、56、70 及 84 d 采集猴静脉血 6 mL, 3 mL EDTA 抗凝, 用于病毒载量和 CD4⁺/CD8⁺ 值测定; 3 mL 肝素抗凝, 用于病毒分离。

1.5 病毒分离

采集肝素抗凝血, 待检全血样本在 24 孔板上做系列 5 倍稀释, 使每孔最后含标本量 200、40、8、1.6、0.32、0.064 μ L。每孔加入 2×10^5 /mL CEMx174 0.4 mL, 最后用含 10% 牛血清 1640 补足每孔 1.6 mL。全血病毒滴度所用的培养基含 IL-2 10 U/mL。3 d 后 IL-2 量可适当降低。置 37℃ 5% CO₂ 孵箱, 次日换液 1 次。以后每周换液两次。每次换液前, 观察每孔有否污染和 CPE。连续观察 4 周, 最高稀释度全血仍能出现 CPE 为该标本的病毒滴度, 以 TCID₅₀/mL 表示。方法详见 [7]。

1.6 外周血单个核淋巴细胞 (PBMCs) 中前病毒 DNA 的检测

感染后第 3 天到第 21 天, 使用巢式 PCR 检测外周血单个核淋巴细胞 (PBMCs) 和病毒分离中前病毒 DNA, 方法详见 [8]。

1.7 血浆病毒载量的测定

使用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 测定血浆病毒载量, 方法为本实验室建立的 RT-PCR 方法, 方法详见 [9]。

1.8 CD4⁺/CD8⁺ 值的测定

50 μ L 的 EDTA 抗凝血加到 12 × 75 mm Falcon 管中, 并与抗体在室温避光作用 15 min 后, 加 10% 溶血素溶血 10 min。后用 PBS 洗 2 次, 1% 多聚甲醛固定并在 Calibur FACS 仪上分类计数。我们分析的指标包括: CD4⁺、CD8⁺ 的百分数和 CD4⁺/CD8⁺ 比值。

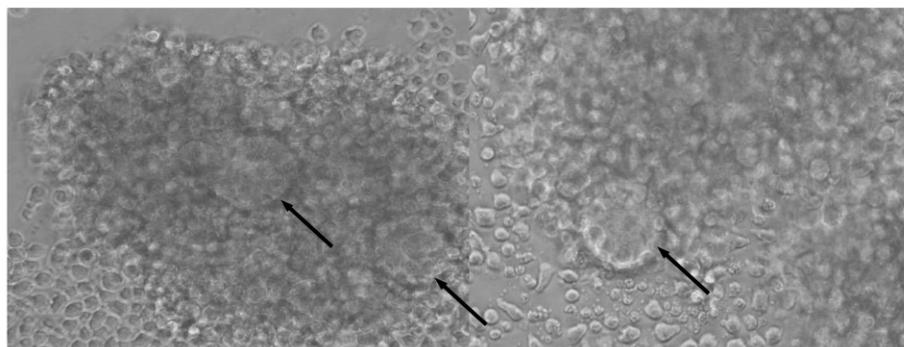
1.9 CD4⁺ 细胞绝对数的测定

根据流式细胞仪测定的 CD4⁺/CD8⁺ 比值、血常规和血涂片结果,计算出 CD4⁺ T 细胞绝对数。

2 结果

2.1 临床表现

本研究中用到的 4 只恒河猴,实验前体检无异常,BV、SIV、SRV、STLV-1 病毒抗体及 PCR 检测阴性。感染 SHIV-KB9 病毒后,A0425 在感染后第 120 天出现食欲不振、水样腹泻、掉毛和体重减轻,到感染后第 130 天发展至严重水样腹泻,至 18 周后,愈发虚弱,直至感染后 149 d 濒临死亡,动物安乐处死,并按计划取材留样。其余感染猴未出现皮疹、体重下降、食欲不振、机会性感染等典型的艾滋病症状。



箭头所示融合细胞

图 1 SHIV-KB9 感染猴全血与 CEMx174 细胞共培养产生的细胞病变

Fig. 1 The Cytopathic effect of CEMx174 cells cocultured with blood of the monkeys with SHIV-KB9 virus infection

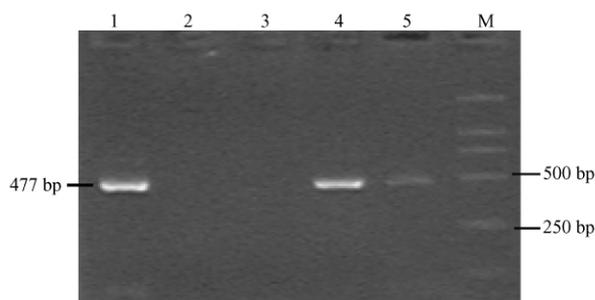


图 2 全血病毒分离阳性细胞和上清电泳结果

Fig. 2 The results of electrophoresis of the virus RNA and DNA isolated from whole blood of the monkeys at 10 days after infection.

注:1:阳性对照 2:阴性对照 3:正常 CEMx174 细胞培养上清对照 A:全血病毒分离阳性孔培养上清 5:全血病毒分离阳性孔细胞 M:DL2000 DNA maker。

Note:1:positive control; 2:negative control;3:culture supernatant of the CEMx174 cells; 4: positive virus supernatant isolated from whole blood; 5:positive cells of the virus isolated from whole blood; M:DL2000 DNA maker.

2.2 病毒分离结果

病毒感染高峰期,全血病毒分离可见融合细胞(cytopathic effect,CPE)(图 1)。融合细胞有数个或数十个 CEMx174 细胞融合而成,首先形成共同外膜,其中的细胞膜被溶解,最后形成大小不一的融合细胞;在高倍镜下,可见其中有多个细胞核存在。同时,我们使用 PCR 方法验证了融合细胞阳性孔确有病毒的存在(图 2)。

2.3 PBMC 中前病毒 DNA 检测结果

SHIV-KB9 感染后,A423-A426 的全基因组被提取并使用巢式 PCR 方法定性测定前病毒 DNA。结果如表 1 A423 在前 5 周的 7 次测定中,都为阳性,A424 在感染后 3、7、28 和 35 d 为阳性,A425 在感染后 3、28、35 d 为阳性,A426 在感染高峰期未见阳性出现。

表 1 A423-A426 前病毒 PCR 结果

Tab.1 The results of provirus of A423-A426 assessed by PCR

动物号 Animal ID.	3 d	7 d	10 d	14 d	21 d	28 d	35 d
A423	+	+	+	+	+	+	+
A424	+	+	-	-	-	+	+
A425	+	-	-	-	-	+	+
A426	-	-	-	-	-	-	-

2.4 血浆病毒载量测定结果

在血浆病毒载量方面,A423 和 A424 在感染后第 7 天首次出现阳性,之后载量上升,A423 于感染后第 14 天达到它的最高峰(9.620E + 07 copies/mL),之后缓慢下降,但在我们的观察期(161 d)内,一直维持在 10³ copies 水平之上。A424 在感染后第 10 天达到一个高峰(5.333E + 05 copies/mL),之后在 10³ ~ 10⁶ 之间波动,到感染后第 56 天达到它的另外一个高峰(6.082E + 06 copies/mL),后在我们的观察期内未检测到病毒载量。

A0425 病毒载量在 28 d 为 $7.22E + 05$ copies/mL, 35 d 达到高峰 $3.51E + 08$ copies/mL, 随后下降, 至 10 周降到了 10^4 copies/mL, 之后出现反弹, 达到 $4.11E + 06$ copies/mL, 并长期维持在这个水平上直至发病。A426 动物在整个实验期间, 未检测到血浆病毒载量阳性(图 3)。

2.5 CD4⁺/CD8⁺ 比值结果

这 4 只实验猴 CD4⁺/CD8⁺ 比例结果显示, 实验前, 其比值均大于 1。接种病毒后, A423-A425 在感染后前 5 周有个下降-回升-再下降的过程, 其

中 A423 于感染后 21 d 降至最低值 0.15, 之后缓慢回升, 在 161 d 之前都在 0.5 之下徘徊, 之后进入波动期, 在 0.26~0.78 之间波动, 但总体趋势是上升的, 并于感染后 357 d 回升至 1.08。A424 在前 5 周有几个幅度较大的波动, 并于感染后 35 d 达到最低点 0.48, 之后缓慢回升, 从第 35 天的 0.48 一直波动回升到第 329 天的 1.67。A425 的初始 CD4⁺/CD8⁺ 比值是 4 只猴中最高的, 它在感染后第 35 天 CD4⁺/CD8⁺ 比值达到最低点 0.0125, 之后缓慢回升, 但一直维持在 0.2 以下, 直至安乐处死。A426

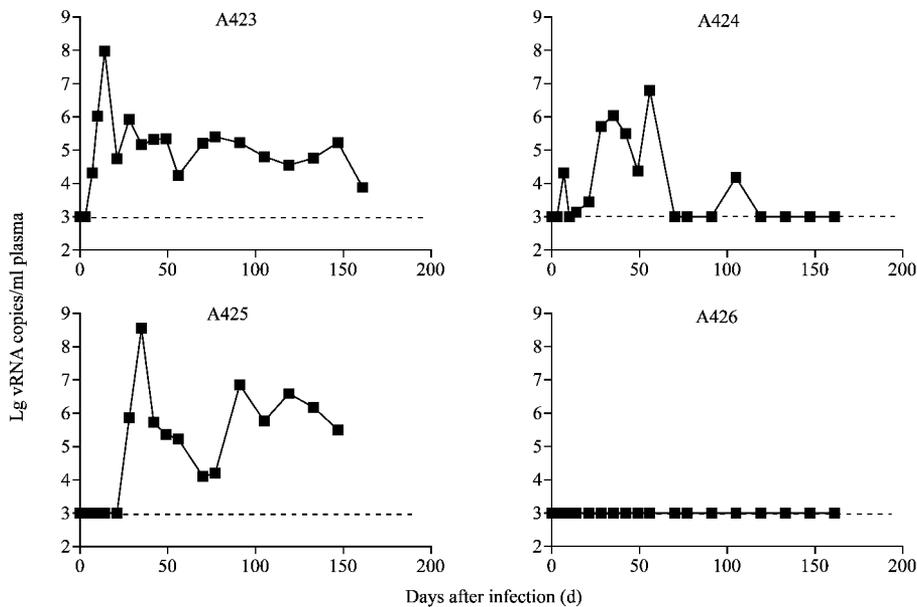


图 3 SHIV-KB9 感染后, A0423-A0425 血浆病毒载量检测结果

Fig. 3 Virus RNA detected in the monkeys A0423-A0425 after SHIV-KB9 virus infection

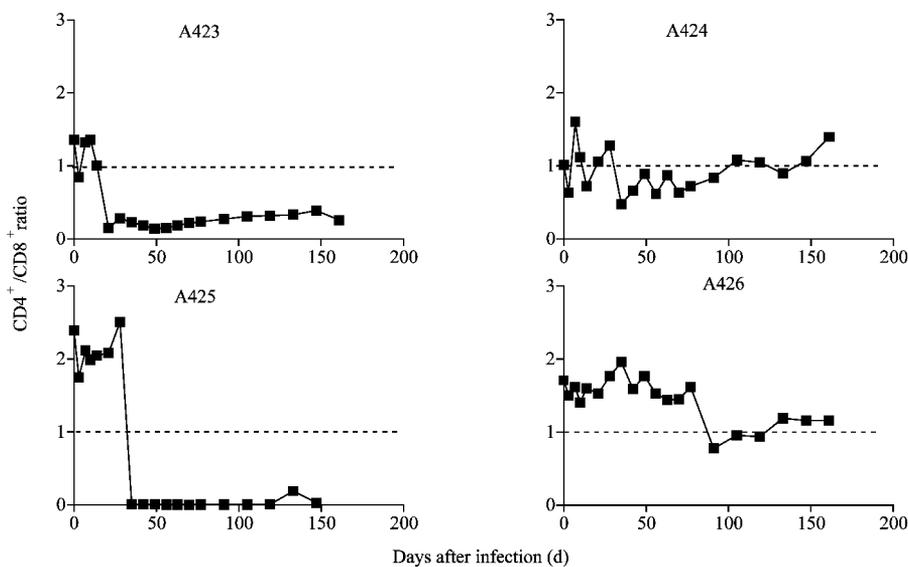


图 4 SHIV-KB9 感染后, A423-A426 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比值

Fig. 4 The CD4⁺/CD8⁺ T lymphocyte ratio of monkeys A423-A426 after SHIV-KB9 virus infection

的 CD4⁺/CD8⁺ 比值在前 3 个月一直未见异常变化,到感染后 91 d 出现下降,之后回升,维持于 1 附近,见图 4。

2.6 CD4⁺ 细胞绝对数结果

病毒感染前,A4023-A0426 四只猴的 CD4⁺ T 细胞绝对数都在 1 000 个/ μ L 以上。SHIV-KB9 感染后 4 只猴在感染后前 3 周都有个上升—下降—再上升—再下降的过程,见图 5。A0423 在感染后 21 d 到达最低点每微升血液中 244 个 CD4⁺ 细胞,之后缓慢上升,到感染后 203 d 超过 1 000 个/ μ L。A0424 在感染后 28 d 到达最低点每微升血液中 418 个 CD4⁺ 细胞,之后波动上升,到感染 7 周之后超过 1 000 个/ μ L。A0425 对 SHIV-KB9 的反应最强烈,在感染后 3 d 它的 CD4⁺ T 细胞绝对数从最初的 1 073 个/ μ L 迅速升到 4 270 个/ μ L,到第 10 天更是升至 5 254 个/ μ L,之后迅速下降,到感染后 35 d 降为 16 个/ μ L,并维持这个水平一直到安乐。A0426 也是在感染后 28 d 到达最低点每微升血液中 465 个 CD4⁺ 细胞,之后波动上升,到感染 11 周之后超过 1 000 个/ μ L。

3 讨论

为建立 SHIV-KB9/中国恒河猴动物模型,明确 SHIV-KB9 的感染剂量是非常必要的。在之前的研究中,我们试用 6 个不同的病毒剂量感染中国恒河猴,通过其血浆病毒载量及前病毒水平、病毒分离、CD4⁺/CD8⁺ 比值及 CD4⁺ 细胞绝对数的测定,进行了包括临床表现、病原学、病毒学和免疫学等方面研究。为了进一步确证 SHIV-KB9 感染中国恒河猴的病毒浓度范围,测试动物对病毒的适应性,明确

动物模型的可重复性,我们接着进行第二批动物实验,以期获得一个稳定而明确的 SHIV-KB9 病毒感染浓度范围,并建立稳定的 SHIV-KB9/中国恒河猴动物模型。

根据上述实验结果,A0423-A0425 三只猴确切感染上了 SHIV-KB9,而且血浆病毒载量、外周血前病毒水平和免疫损伤程度三者之间是正相关的。而 A0426 可能由于注射的病毒量低而没被感染。其中,A0425 (10⁻³ 病毒感染猴) 出现体重下降、食欲不振、机会性感染等典型的艾滋病症状,而其他 3 只动物未见明显临床表现。

A0425 出现了 CD4⁺ T 细胞严重衰竭的现象。Reimann 等人的研究证明:印度恒河猴在感染 SHIV-KB9 后,存在两种不同的疾病进程。一些实验猴在感染后的 2~3 周内,CD4⁺ T 细胞数达到最低点,每微升猴血的 CD4⁺ T 细胞数小于 50,且不会回升;相反,大部分实验猴感染后达到最低点,每微升猴血的 CD4⁺ T 细胞数大于 50,之后 CD4⁺ T 细胞数有部分反弹,但一直位于感染前 CD4⁺ 细胞数的 50% 以下^[7]。在本研究中,我们可以看到 3 种不同的疾病进程:(1) 病毒感染后,CD4⁺ T 细胞数急剧下降,每微升猴血的 CD4⁺ 细胞数小于 50,且不会回升,与印度恒河猴的第一种情况类似,如 A425;(2) CD4⁺ T 细胞迅速而急剧的减少,到达最低点(每微升猴血含有 63 个细胞)后,缓慢回升,与印度恒河猴的第二种情况类似,如 A419^[6];(3) 病毒感染后,CD4⁺ T 细胞数下降,但每微升猴血的 CD4⁺ T 细胞数大于 200,如 A423 和 A424。

如上所述,本实验中,A0423 和 A0424 虽然感染剂量比 A0425 高,但不如 A0425 病程严重,我们认

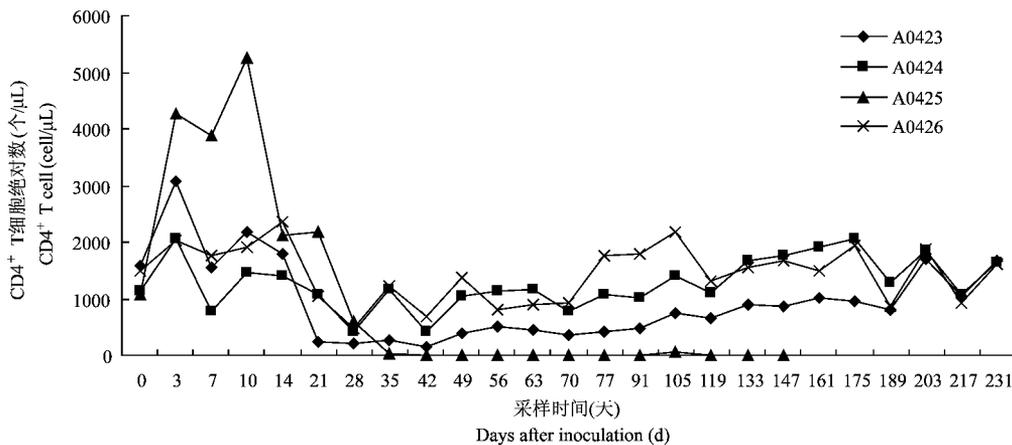


图 5 SHIV-KB9 感染猴 A0423-A0426 的 CD4⁺ T 细胞绝对数折线图

Fig. 5 CD4⁺ T lymphocytes in the monkeys A0423-A0426 infected with SHIV-KB9 virus

为主要是因为中国恒河猴的个体差异明显,可能是实验猴组织相容性复合物(MHC) I 类或 II 类分子在其中起重要作用;而且相对于印度恒河猴,中国恒河猴遗传背景资料贫乏,各项指标的正常值都不明确,严重影响了中国恒河猴的研究和应用,急需进行更深入的研究。

在本研究中,使用了全血病毒分离方法,从结果来看,效果较好,而且相对于分离 PBMC 的病毒分离方法,步骤简单、实用。

参考文献:

- [1] Joag SV. Primate models of AIDS [J]. *Microbes Infect*, 2000, 2(2): 223-229.
- [2] Smaglik E. AIDS vaccine researchers turn from chimps to monkeys [J]. *Scientist*, 1999, 13(16): 7-9.
- [3] Veazey RS, Lifson J D, Pandrea I, et al. Simian immunodeficiency virus infection in neonatal macaques [J]. *J Virol* 2003, 77(16): 8783-8792.
- [4] Reimann KA, Parker RA, Seaman MS, et al. Pathogenicity of simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P and SIVmac is attenuated in cynomolgus macaques and associated with early T-lymphocyte responses [J]. *J Virol*, 2005, 79(14): 8878-8885.
- [5] Ling B, Veazey RS, Luckay A, et al. SIV(mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans [J]. *AIDS*, 2002, 26(11): 1489-1496.
- [6] 王卫, 刘强, 许琰, 等. SHIV-KB9 感染中国恒河猴的实验研究 [J]. *中国比较医学杂志* 2007, 17(2): 67-71.
- [7] 丛喆, 吴小闲, 蒋虹, 等. 全血分离猴免疫缺陷病毒(SIV)的效果观察 [J]. *中国性病艾滋病防治*, 1997, 3(5): 218-219.
- [8] 丛喆, 涂新明, 蒋虹, 等. PCR 技术在猴免疫缺陷病毒(SIV)感染模型中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13(2): 84-87.
- [9] 丛喆, 李兆忠, 魏强, 等. SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 测定猴免疫缺陷病毒(SIV) RNA 拷贝数方法的建立 [J]. *中国实验动物学报* 2006, 14(4): 271-275.
- [10] Reimann KA, Watson A, Peter J. Viral burden and disease progression in rhesus monkeys infected with chimeric simian-human immunodeficiency viruses [J]. *Virology*, 1999, 256: 15-21.
- [11] Ling B, Veazey RS, Penedo C, et al. Longitudinal follow up of SIVmac pathogenesis in rhesus macaques of Chinese origin: emergence of B cell lymphoma [J]. *J Med Primatol* 2002, 31(4-5): 154-163.

修回日期) 2010-09-29



《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》征订启事

《中国实验动物学报》、《中国比较医学杂志》是由中国实验动物学会和中国医学科学院医学实验动物研究所主办发行的国家级学术刊物,从 2000 年起已被列入中国科技论文统计源期刊。

刊载内容:刊载有关实验动物和动物实验的理论专著、科研成果论文、科学实验新方法、新材料、实验动物新资源开发、新的动物品系的培育和应用以及与实验动物有关的其他学科的科学论述。

开设栏目:《中国实验动物学报》开设有研究论著和研究快报;《中国比较医学杂志》开设有研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息等。

读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:《中国实验动物学报》:双月刊,大 16 开本,92 页。双月末出版,每期 20 元,全年 6 期,合计 120 元。邮发代号:2-748

《中国比较医学杂志》:月刊,大 16 开本,80 页。月末出版,每期 20 元,全年 12 期,合计 240 元。邮发代号:82-917。

汇款方式:(1) 邮局汇款:北京市朝阳区潘家园南里 5 号,100021,编辑部收

(2) 银行转帐:开户银行 农行潘家园分理处

帐 号 11-220201040003764

银行户名 中国实验动物学会

请注明订阅“学报”或者“杂志”字样以及订刊数量,并写明刊物寄往的详细地址及收件人姓名。收到汇款后,我们会及时将发票寄给您。