



SHIV1157ipd3N4 细胞适应株的制备及其生物特性

丛喆 姚南 刘浩 金光 陶真 陈霆 魏强

(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)

【摘要】 目的 体外制备 SHIV1157ipd3N4 病毒中国恒河猴细胞适应株, 在细胞水平和中国恒河猴体内评价其生物学特性。方法 用 SHIV1157ipd3N4 病毒阴道感染中国恒河猴, 在血浆病毒载量高峰期采血分离外周血单核淋巴细胞 (PBMCs), 与正常中国恒河猴 PBMCs 共培养。定期测定培养液中的 P24 抗原水平。当病毒复制达高峰期时收集培养上清, 分装并冻存。测定病毒 RNA 载量、P24 抗原浓度和 TCID₅₀。静脉感染中国恒河猴, 研究该批次 SHIV1157ipd3N4 在体内的病毒学、免疫学指标变化及变异情况, 分析其基本的生物学特性。结果 本研究共制备了 243 mL SHIV1157ipd3N4 病毒原液, gp120 序列分析表明病毒未发生变异, CCR5 的嗜性也未发生改变。病毒载量为 1.586×10^8 copies/mL, P24 抗原水平为 1.16×10^3 pg/mL, TZM-bl 细胞测定病毒的 TCID₅₀ 为 3.16×10^3 /mL。1 mL SHIV1157ipd3N4 静脉成功感染中国恒河猴 G1004V, 高峰期病毒载量达到 1.0×10^6 copies/mL 以上。结论 此次制备的 SHIV1157ipd3N4 细胞适应株生物学特性稳定, 适合作为毒种库构建 SHIV1157ipd3N4/中国恒河猴模型。

【关键词】 SHIV1157ipd3N4; CCR5 嗜性; 中国恒河猴; 外周血单核淋巴细胞; 半数感染量

【中图分类号】 R373; R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)02-0012-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.02.03

Propagation and Characterization of SHIV1157ipd3N4 Adaptive Virus Stock in Chinese-Origin Rhesus Macaques

CONG Zhe, YAO Nan, LIU Hao, JIN Guang, TAO Zhen, CHEN Ting, WEI Qiang

(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)

【Abstract】 Objective To propagate SHIV1157ipd3N4 virus stock via passages in Chinese-origin monkey peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). **Methods** The PBMCs from Chinese-origin rhesus macaque were cocultured with SHIV1157ipd3N4, a CCR5-tropic chimeric simian-human immunodeficiency virus (SHIV) strain. The level of P24 antigen in the supernatant was tested continuously. The virus stock was collected when the viral duplication reached a peak. The env gene of SHIV1157ipd3N4 was analyzed and the viral load, P24 antigen level and TCID₅₀ were determined. The rhesus monkey G1004V was infected with this batch of SHIV1157ipd3N4 intravenously. The viral load in plasma and the changes of CD4⁺/CD8⁺ ratio were analyzed by real-time RT-PCR and flow cytometry. **Results** Totally 243 mL virus stock was propagated in monkeys PBMCs. The viral load was 1.586×10^8 copies/mL, the level of P24 antigen was 1.16×10^3 pg/mL and had 3.16×10^3 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) in 1 mL of cell-free SHIV1157ipd3N4. There was no variation in the gp120 sequence of env gene and this SHIV1157ipd3N4 stock was still exclusively CCR5-tropic. The monkey G1004V was infected

[基金项目] 国家十一五科技重大专项课题 (2009ZX10004-402, 2008ZX10001-015-10)。

[作者简介] 丛喆, 硕士, 主管技师, 从事实验动物病毒分子生物学和模型研究工作。

[通讯作者] 魏强, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@sohu.com。

and had a high level of viral loads in plasma. **Conclusion** This panel of pathogenic R5-tropic SHIV1-57ipd3N4 was adapted in Chinese-origin rhesus monkeys PBMCs and is stable and suitable to serve as an animal model.

【Key words】 SHIV1157ipd3N4; CCR5-Specific; Chinese-origin rhesus monkeys; PBMCs; TCID₅₀

R5-SHIV1157i 是由美国 Dana-Farber Cancer 研究所 Ruth Ruprecht 教授实验室由一名赞比亚 6 个月大的婴儿身上分离的致病株,经一系列动物体内传代和基因改造,制备出具有高致病能力的 CCR5 嗜性的 C 亚型强毒株 SHIV1157ipd3N4^[1-4]。本研究拟利用中国恒河猴 PBMCs 一次性大量制备 SHIV1157ipd3N4 细胞适应株,建立相应的病毒库,了解其生物学特性,以期在今后的艾滋病疫苗和药物评价中加以应用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

恒河猴 2 只(0705046 和 G1004V) 购自北京协尔鑫生物资源研究所(一级动物,合格证编号:SCXK(京)2005-0005),用商品化膨化饲料饲养,体重 3 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)检查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。

1.2 SHIV1157ipd3N4

由美国 Dana-Farber Cancer 研究所 Ruth Ruprecht 教授惠赠。中国恒河猴 PBMCs 细胞滴定 TCID₅₀为 1 × 10³/mL,10 ~ 20 TCID₅₀/mL 连续阴道感染中国恒河猴 0705046。

1.3 SHIV1157ipd3N4 病毒的分离与细胞适应株的大量制备^[5]

SHIV1157ipd3N4 病毒感染中国恒河猴 0705046 后,定期采集 EDTA 抗凝全血,分离血浆提取病毒 RNA,Real-time RT-PCR 方法检测血浆病毒载量。当病毒载量达到高峰期时,取血分离外周血单核淋巴细胞,进行 CD8⁺T 细胞敲除,剩余的 CD8⁻T 细胞加入含 SEB(0.5 μg/mL)、IL-2(50 U/mL)、丙酮酸钠、非必需氨基酸的 1640 生长液,5% CO₂、37℃ 培养。3 d 后,与同样处理的正常猴 CD8⁻T 细胞按 1:1 比例混合共培养。每隔 2 ~ 3 d 测定上清液中 P24 抗原浓度。根据细胞生长状态适时更换添加培养基和新的 PBMCs 细胞,以维持细胞的正常生长状态。当上清液中 P24 抗原浓度大于 1 ng/mL 时收集病毒,分装,液氮保存。

1.4 SHIV1157ipd3N4 细胞适应株 gp120 序列扩

增及测序^[6]

使用 Takara One Step RNA PCR Kit(大连宝生物,DRR024A)扩增病毒 *env* 区 6210-7846 间长度为 1636 bp 的序列,PCR 产物切胶回收纯化后测序,进行序列分析。

1.5 SHIV1157ipd3N4 细胞适应株病毒学指标的测定

将 SHIV1157ipd3N4 病毒原液 10 倍梯度稀释,用 HIV-1 Antigen microelisa system”(Biomerieux, 284033)测定病毒液 P24 抗原浓度。用 TZM-bl 细胞滴定 SHIV_{SF162P3} 病毒的 TCID₅₀,三次滴定的结果取平均值作为最终的 TCID₅₀^[7]。取病毒液 200 μL,TRIzol 法提取病毒 RNA,SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 法测定病毒 RNA 载量^[8]。

1.6 SHIV1157ipd3N4 细胞适应株生物学特性的恒河猴体内评价

SHIV1157ipd3N4 细胞适应株 1 mL 静脉感染中国恒河猴 G1004V,定期采集 EDTA 抗凝全血,real-time RT-PCR 方法检测血浆病毒载量,测定外周血 CD4⁺/CD8⁺和 CD4⁺T 淋巴细胞绝对数。

2 结果

2.1 SHIV1157ipd3N4 阴道感染猴 0705046 血浆病毒载量的结果

感染猴 0705046 在感染后 11 d 血浆病毒载量呈阳性,19 d 达到 2.151 × 10⁷ copies/mL。22 d 采集

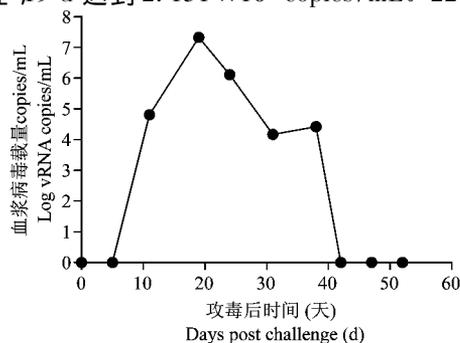


图 1 SHIV 1157ipd3N4 病毒阴道途径感染猴 0705046 血浆病毒载量结果

Fig. 1 Changes of the viral load in plasma of SHIV1157ipd3N4-inoculated rhesus monkeys intravaginally

EDTA 抗凝血 9 mL, 分离 PBMCs。22 d 的血浆病毒载量为 1.321×10^6 copies/mL。

2.2 SHIV1157ipd3N4 病毒细胞适应株的大量制备

感染猴和正常猴 CD8⁺T 细胞刺激 3 d 后合并培养。整个传代过程中 PBMCs 生长状态良好, 经 SEB 刺激出现明显的增殖成团现象。在合并后 7 d 传代并添加新的刺激好的正常猴 PBMCs, 偶见少数体积较小的融合细胞(图 2)。合并后 9 d 收集病毒液 243 mL。最终测定 P24 抗原浓度为 1.16×10^3 pg/mL, 病毒载量为 1.586×10^8 copies/mL, TZM-bl 细胞滴定 TCID₅₀ 为 3.16×10^3 /mL。

2.3 SHIV1157ipd3N4 细胞适应株 env 基因序列测定

巢氏 RT-PCR 扩增 SHIV1157ipd3N4 细胞适应株的 env 基因 gp120 序列, BioEdit 软件分析与

SHIV1157ipd3N4 序列 (DQ779174.1) 相似度为 99%。在 7100 bp 有一个腺嘌呤“A”插入, 7277 bp 处胞嘧啶“C”变成腺嘌呤“A”。经 Env 区序列对应的氨基酸序列分析发现没有引起氨基酸序列的改变及糖基化位点的改变, V3 区顶端四肽没有改变。

2.4 SHIV1157ipd3N4 细胞适应株感染猴 G1004V 血浆病毒载量、CD4⁺/CD8⁺ 及 CD4⁺T 细胞绝对数结果

SHIV1157ipd3N4 细胞适应株感染猴 G1004V 感染后 7 d 即检测到较强的血浆病毒载量, 并且从 10 d 到 21 d 一直维持在 1.0×10^6 copies/mL 以上, 随后迅速下降, 28 d 已降至 8.2×10^4 copies/mL, 直至 96 d 再未检测到。伴随着载量的高峰, G1004V 在感染后 10 d 起 CD4⁺/CD8⁺ 有一个大幅下降, 从 2.15 降至 0.78, 随后缓慢上升。与此同时, CD4⁺T 细胞绝对数在这个阶段也有一个下降, 维持在 600 ~ 800 个/mL 之间(图 3)。

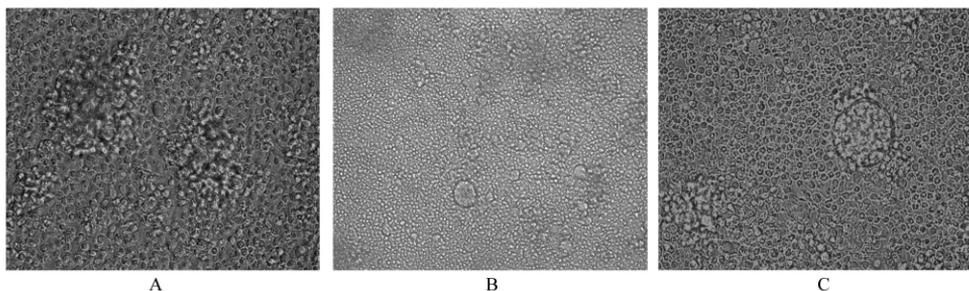


图 2 正常及接种 SHIV1157ipd3N4 病毒的猴 PBMCs 细胞形态变化

Fig. 2 Changes of the PBMCs from normal Chinese-origin rhesus monkeys and monkeys after SHIV1157ipd3N4 infection

A. 正常中国恒河猴 PBMCs 细胞; B. 接种 SHIV1157ipd3N4 病毒 7 d 的猴 PBMCs 细胞, 细胞融合, 出现巨大融合细胞; C. 接种 SHIV1157ipd3N4 病毒 7 d 的猴 PBMCs 细胞, 细胞融合, 出现巨大融合细胞
A. The PBMCs from normal Chinese-origin rhesus monkeys; B. 7 days after SHIV1157ipd3N4 infection of the monkey PBMCs cells. Apparent cytopathic effect (CPE) and large fusion cells can be seen; C. 7 days after SHIV1157ipd3N4 infection of the Chinese-origin rhesus monkey PBMCs. Apparent cytopathic effect (CPE) and large fusion cells can be seen.

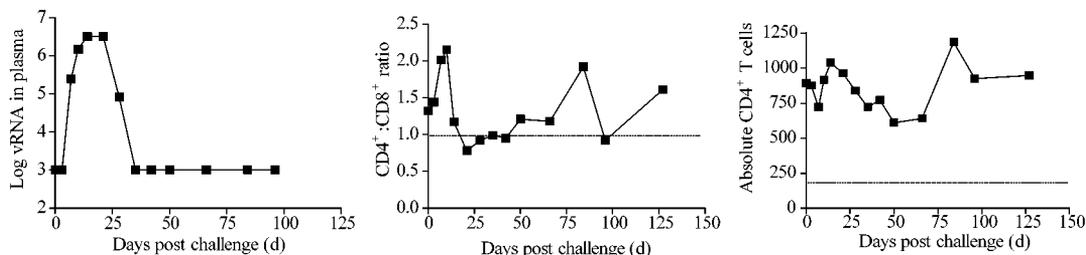


图 3 SHIV1157ipd3N4 感染恒河猴后外周血病毒载量、CD4⁺/CD8⁺ 和 CD4⁺T 细胞绝对数变化趋势

Fig. 3 The changes of viral loads, CD4⁺/CD8⁺ and absolute CD4⁺T cells in peripheral blood after SHIV1157ipd3N4 infection

3 讨论

人免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus-1, HIV-1) C 亚型是世界上流行的 HIV 主要亚型, 大约导致了世界上 50% 以上的感染。目前大多数 SHIV 毒株所利用的 env 基因都源自 HIV-1 B 亚型, 因此现有的 SHIV 病毒并没有反应出当前 HIV-1 流行趋势。另外, 世界上超过 90% 的 HIV 感染与黏膜传播有关, 包括性传播和母婴传播^[9]。因此一株能够通过黏膜传播的带有 HIV-1 C 亚型 env 区的 SHIV 病毒是研究 HIV 感染和发病机制及评价 AIDS 候选疫苗功效所需要的。

R. M. Ruprecht 小组从一个 6 个月大的赞比亚婴儿身上分离并构建的 SHIV-1157i 及其传代病毒 SHIV1157ipd3N4 是具有高度复制能力的、CCR5 受体嗜性、经黏膜传播的带有 HIV-1 C 亚型 env 区的 SHIV 株, 成功地通过黏膜途径感染恒河猴和猪尾猴并诱发 AIDS, 尤其在恒河猴体内缓慢的发病进程与人类感染 HIV-1 相似。因此, SHIV-1157i 及 SHIV1157ipd3N4 感染的恒河猴模型对研究人类 HIV 感染的发病机制和研究以 env 区为目标的 AIDS 疫苗具有重要意义。

本研究采用磁性细胞分选等技术首次制备了大批量的 SHIV1157ipd3N4 中国恒河猴 PBMC 细胞适应株。T₂M-b1 细胞滴定 TCID₅₀ 为 3.16×10^3 / mL, 中国恒河猴 PBMCs 细胞滴定 TCID₅₀ 为 5×10^2 / mL, 相比 R. M. Ruprecht 教授提供的 SHIV1157ipd3N4 的 TCID₅₀ 略低, 尤其是 T₂M-b1 细胞滴定的结果更是低了接近 100 倍。由于 R. M. Ruprecht 教授使用印度恒河猴进行病毒的传代及扩增, 一直以来国际上也公认印度恒河猴比中国恒河猴对 SIV/SHIV 的敏感性更高, 反应更强, 我们的结果更证实了这一点^[10]。本研究中, SHIV1157ipd3N4 经过中国恒河猴猴体的感染和猴 PBMCs 的扩增, env 基因 gp120 区段碱基没有发生明显变异, 对应的氨基酸序列也同样没有改变, SHIV1157ipd3N4 中国恒河猴适应株依然保持 CCR5 单嗜性。多次传代后这一特性并没有发生突变或丢失证明了 SHIV1157ipd3N4 在中国恒河猴猴体内的稳定性。本批次 SHIV1157ipd3N4 静脉途径成功感染中国恒河猴, 出现规律的血浆病毒血症, 高峰期载量达到 10^6 copies/mL 以上。但外周血 CD4⁺/CD8⁺ 没有显著的下降, CD4⁺ T 细胞绝对数没有明显的变化, 这

些与国外的报道是一致的。

目前为止, SHIV 1157ipd3N4 毒株是第一例报道的 CCR5 单嗜性的 C 亚型强毒株。通过中国恒河猴 PBMCs 体外传代过程使之获得了在中国恒河猴体内的适应能力, 同时 SHIV1157ipd3N4 的 CCR5 嗜性和黏膜感染特点使其成为研究 C 亚型 HIV-1 流行株黏膜途径感染机制的理想模型。本研究中制备的 SHIV1157ipd3N4 细胞适应株生物学特性稳定, 适合作为毒种库构建 SHIV1157ipd3N4/中国恒河猴模型, 在今后 C 亚型疫苗的评价中必将发挥重要的作用。

参考文献:

- [1] Song RJ, Chenine AL, Rasmussen RA, et al. Molecularly cloned SHIV-1157ipd3N4: a highly replication competent, mucosally transmissible R5 simian-human immunodeficiency virus encoding HIV Clade C env [J]. J Virol 2006, 80(17): 8729-8738.
- [2] Humbert M, Rasmussen RA, Song RJ, et al. SHIV-1157i and passaged progeny viruses encoding R5 HIV-1 clade C env cause AIDS in rhesus monkeys [J]. Retrovirology 2008, 5:94.
- [3] On Ho, Kay Larsen, Patricia Polacino, et al. Pathogenic infection of Macaca nemestrina with a CCR5-tropic subtype-C simian-human immunodeficiency virus [J]. Retrovirology 2009, 6:65.
- [4] Rasmussen RA, Ong H, Song RJ, et al. Efficacy of a multigenic protein vaccine containing multimeric HIV gp160 against heterologous SHIV clade C challenges [J]. AIDS, 2007, 21(14): 1841-1848.
- [5] 刘浩, 刘强, 丛喆, 等. 模拟 HIV 性传播特点的 SIVmac239 中国恒河猴直肠黏膜感染研究 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4): 271-275.
- [6] Liu Q, Yang GB, Ma Y, et al. Sequence variation in the Gp120 region of SHIV-CN97001 during in vivo passaging [J]. Virol Sinica 2008, 23(1): 8-14.
- [7] Li M, Gao F, Mascola JR, et al. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies [J]. J Virology 2005, 10108-10125.
- [8] 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.
- [9] Pope M, Haase AT. Transmission acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection [J]. Nat Med, 2003, 9(7): 847-852.
- [10] 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] 2002, 31(4-5): 154-163.

(修回日期) 2010-10-18