



B亚型 SHIV_{SF162p3} 中国恒河猴小剂量 多次阴道黏膜感染

丛喆¹, 刘浩¹, 朵建英¹, 王卫¹, 蒋虹¹, 高虹¹, 杨志伟¹,
Sylvain Fleury², 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. Mymetics Corporation, CH 1066 Epalinges, Switzerland)

【摘要】 目的 模拟 HIV 性传播感染特点进行中国恒河猴阴道黏膜小剂量多次感染研究, 为我国艾滋病疫苗有效性评价提供新的模型构建思路。方法 选用 20-30TCID₅₀ 剂量的 SHIV_{SF162p3} 病毒阴道黏膜途径感染六只成年雌性中国恒河猴, 共感染 13 次, 每次攻毒间隔 4~7 d。采取测定血浆病毒载量和外周血 CD4⁺:CD8⁺。结果 6 只中国恒河猴经 13 次病毒攻击后, 经检测均建立系统性感染, 血浆病毒载量呈阳性; CD4⁺:CD8⁺ 均有下降。结论 成功建立了中国恒河猴阴道黏膜小剂量多次感染模型, 为艾滋病研究提供了新的更接近于自然感染状态的模型建立模式。

【关键词】 猴-人免疫缺陷病毒 (SHIV); 模型; 动物; 黏膜感染

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)02-0044-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.02.10

Efficient Repeated Low-Dose Intravaginal Infection with SHIV_{SF162p3} in Chinese-Origin Rhesus Macaques

CONG Zhe¹, LIU Hao¹, DUO Jiang-ying¹, WANG Wei¹, JIANG Hong¹, GAO Hong¹,
YANG Zhi-wei¹, Sylvain Fleury², 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. Mymetics Corporation, CH 1066 Epalinges, Switzerland)

【Abstract】 Objective Nonhuman primate models are increasingly used in the screening of candidate AIDS vaccines and immunization strategies for advancement to large-scale human trials. The predictive value of such macaque studies is largely dependent upon the fidelity of the model system in mimicking human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in terms of viral transmission, replication, and pathogenesis. The aim of this study was to establish a Chinese-origin rhesus monkey model of CCR5-specific chimeric simian/human immunodeficiency virus (SHIV_{SF162p3}) infection, induced by repeated low-dose intravaginal infection, and explore whether this new chimeric model could be more efficient in

【基金项目】 国家十一五科技重大专项课题 (2009ZX10004-402, 2008ZX10001-015-40); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (DWS 201009)。

【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】 秦川, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子病理学, 疾病模型。E-mail: Qinchuan@pumc.edu.cn。

AIDS vaccine research. **Methods** Totally 6 female Chinese-origin rhesus monkeys were enrolled in this study. All animals were intra-vaginally challenged 13 times with 1 mL of a phosphate buffered virus solution containing the heterologous SHIV_{SF162p3}, with 20 TCID₅₀ for the first 7 challenges and 30 TCID₅₀ for the remaining 6 challenges. Challenges were done every 4-7 days. Whole blood was collected and plasma virus was quantified by real-time SYBR green RT-PCR and T cell subsets were determined by flow cytometry analysis. **Results** Systemic infection was successfully established in 6 Chinese-origin rhesus macaques after 13 challenges. The peak of viral loads was between 10⁶ copies/mL to 10⁸ copies/mL, whereas their CD4⁺/CD8⁺ ratio was decreased. **Conclusions** The results of this study provide a firm basis for establishing a Chinese rhesus macaques model of SHIV infection by repeated low dose of SHIV_{SF162p3}, a route more close to natural way of AIDS infection. This model would be very useful for HIV-1 subtype B vaccine and pathogenesis studies.

【Key words】 SHIV; Animal model; vaginal transmission; Chinese-origin rhesus monkey

近年来,我国艾滋病流行趋势和特点发生了很大改变。2007 年数据显示,性传播已经成为最主要的传播途径。严峻的流行形式和流行特点迫切需要研制出安全有效的艾滋病黏膜疫苗。随着艾滋病感染机制的深入研究,提倡建立模拟自然感染方式的动物模型进行候选疫苗的安全性、有效性以及免疫策略评价。因此,进行模拟 HIV 性传播特点的恒河猴黏膜感染研究显得非常迫切和重要。本文用致病性 SHIV_{SF162p3} 按小剂量多次感染的方法经阴道途径连续接种中国恒河猴,分析感染模型病毒学、细胞学以及免疫学等方面的变化特点,为今后利用此黏膜模型进行艾滋病早期感染和发病机制以及疫苗和杀微生物剂有效性评价等研究提供相关实验数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

恒河猴 6 只,实验编号分别为 1-1、1-2、1-3、1-4、1-5、1-6。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 4~6 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。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^[1]。

1.2 感染毒株

感染毒株为 SHIV_{SF162p3},由美国 NIH 提供,中国恒河猴 PBMCs 滴定病毒原液 TCID₅₀ 滴度为 1 × 10⁴ TCID₅₀/mL。

1.3 感染方法^[2]

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 2 mL 预冷的无菌 PBS 清洗阴道。再将稀释好的适当浓度的病毒液 1 mL 缓慢推入。实验猴保持此姿势 30 min。

1.4 感染剂量和 SHIV_{SF162p3} 感染猴血样的采集和处理

感染采取小量多次的方法,共感染 13 次。前 6 次使用 20TCID₅₀ 的 SHIV_{SF162p3},后 7 次使用 30TCID₅₀ 的 SHIV_{SF162p3},间隔 4~7 d,即分别在 0、7、11、16、20、23、27、31、37、45、50、57 d 和 64 d 进行阴道感染。在每次感染前及 13 次感染结束后,即 71、85、98、114、126、140、154、168、182、203、217 d 及 246 d 采 EDTA 抗凝血 3 mL,分别测定外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值及血浆病毒载量。

1.5 SHIV_{SF162p3} 感染猴血浆病毒载量的测定^[3]

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。

1.6 SHIV_{SF162p3} 感染猴外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值及绝对数测定^[4]

CD3-PerCP (BD, 552851)、CD4-FITC (BD, 550628)、CD8-PE (BD, 557086) 抗体标记 EDTA 抗凝全血中淋巴细胞,流式细胞仪(Calibur FACS)测定 CD4⁺/CD8⁺ 比值。根据 Facs Calibur 测定的 CD4⁺/CD8⁺ 比值、血常规结果,计算出 CD4⁺ 细胞绝对数。

2 结果

2.1 SHIV_{SF162p3} 感染猴外周血血浆病毒载量

6 只实验猴都先后出现了血浆病毒载量。1-1 感染后 27 d 出现载量,37 d 达到高峰(6.498 × 10⁷ copies/mL),57 d 载量检测阴性消失,但在 85 d 载量再次出现,直至 246 d 载量一直都维持在 10⁵ copies/mL 左右。1-2 病毒载量出现最早,初次感染

后的 23 d 达到 5.665×10^5 copies/mL, 27 d 达到高峰 (2.1×10^7 copies/mL), 随后下降, 至 57 d 检测呈阴性, 共持续了 4 周时间, 并且一直到第 246 d 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 37 d, 高峰期在 45 d, 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 4 d 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 31 d (4.72×10^6 copies/mL), 维持了 3 周左右的载量。不同的是, 它们分别在感染后 154 d 和 203 d 出现一

过性小幅反弹, 载量水平只在 $10^3 \sim 10^4$ copies/mL 之间。1-5 和 1-6 的载量出现最晚, 均出现在感染后 50 d, 并且不连续, 没有明显的高峰, 始终维持在 $10^4 \sim 10^6$ copies/mL 的水平(图 1)。

2.2 SHIV_{SF162p3} 感染猴外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值

6 只实验猴的 CD4⁺/CD8⁺ 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 37 d CD4⁺/CD8⁺ 比值迅速从感染后 31 d 的 1.51 下降到 0.50, 并且持续走低, 到 300 d 时, 已降低到 0.35。1-2 和 1-4 总体没有太大

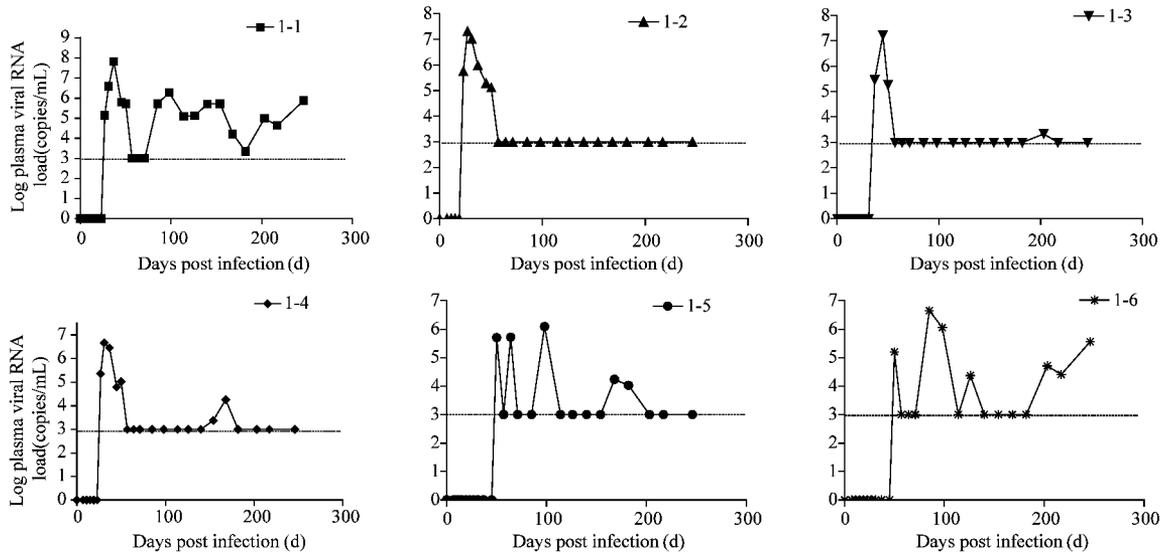


图 1 SHIV_{SF162p3} 小剂量多次阴道途径感染恒河猴血浆病毒载量结果

Fig. 1 The viremia (viral RNA copies/mL plasma) in the Chinese-origin rhesus macaques infected IVAG with repeated low dose of SHIV_{SF162p3}

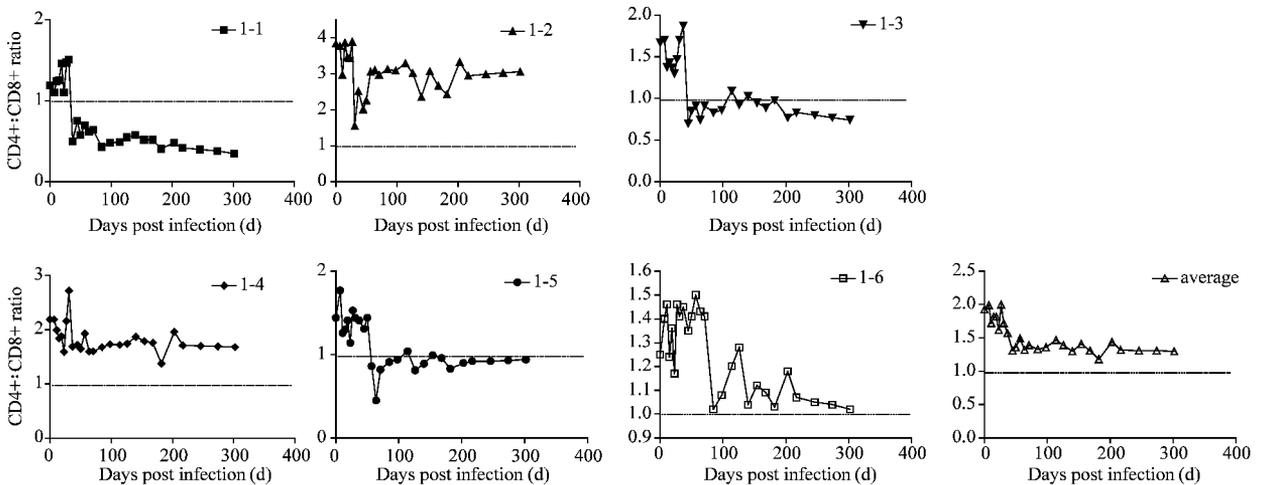


图 2 SHIV_{SF162p3} 小剂量多次阴道途径感染恒河猴外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值

Fig. 2 Changes of CD4⁺/CD8⁺ ratio of T lymphocytes in the Chinese-origin rhesus macaques infected IVAG with repeated low dose of SHIV_{SF162p3}

的变化,但分别在感染后 31 d 和 37 d 有一个下降过程。1-2 由 27 d 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 182 d 有一个小幅波动。1-3 和 1-5 变化基本相同,分别在感染后 45 d 和 64 d 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 85 d (图 2)。

2.3 SHIV_{SF162p3}感染猴外周血 CD4⁺T 细胞绝对数

所有实验猴的 CD4⁺细胞绝对数在感染 50 d 内都基本保持稳定,在 1 000 个/ μ L 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 274 d 时,已降到 293 个细胞/ μ L 猴血(图 3)。

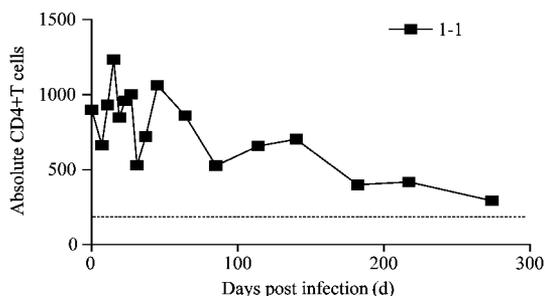


图 3 SHIV_{SF162p3}阴道途径感染恒河猴 1-1 外周血 CD4⁺T 细胞绝对数的变化

Fig. 3 The CD4⁺T cell counts (per 1 μ L blood) in the Chinese-origin rhesus macaque 1-1 infected IVAG with repeated low dose of SHIV_{SF162p3}

3 讨论

流行病学调查显示,近年来,在世界范围内性传播是 HIV-1 感染的主要原因并且这种传播趋势仍呈上升状态。因此,阴道途径感染的恒河猴模型更能符合艾滋病感染的新趋势并成为当今关注的热点。在灵长类动物中,紧贴子宫阴道上皮的黏膜固有层中存在大量的郎格汉斯细胞(Langhans cell),而这种细胞只表达 CCR5 受体而不表达 CXCR4 受体。因此,作为单一 CCR5 受体特异性的 SHIV_{SF162p3} 病毒的生物学优势显现出来,成为目前国际上应用比较多的黏膜途径感染用 SHIV 病毒。而小剂量多次感染也由于更接近人的自然感染状态,成为目前一种比较新颖的攻毒策略。

本研究中我们使用 Cecilia 教授提供的 SHIV_{SF162p3},并采用小剂量连续多次阴道感染的策略,感染 6 只中国恒河猴,共攻毒 13 次,前 6 次剂量为 20TCID₅₀,后 7 次为 30TCID₅₀,比 Cecilia 教授等使用的 50TCID₅₀要低一倍左右^[5]。第一只动物阳转是在第 6 次攻毒后,到 13 次攻毒结束后,6 只实验猴已全部被感染。所有实验猴的病毒载量高峰都达到了 10⁶ copies/mL ~ 10⁷ copies/mL,并且病毒载量的峰值和 CD4⁺/CD8⁺ 的低值之间是一一对应的,尤其是出现较早的 1-1 到 1-4,这和 Cecilia 等人采用小剂量连续多次阴道感染印度恒河猴的实验数据是基本相同的,只是载量的峰值略高一个数量级(Cecilia 教授感染印度恒河猴的载量高峰在 10⁵ copies/mL ~ 10⁶ copies/mL 之间)。并且除 1-1 以外,其它实验猴外周血中 CD4⁺T 细胞绝对数没有大的变化,这一点也与 Cecilia 教授观察到的结果相同。但 1-1 出现的持续的 CD4⁺T 细胞绝对数的下降,并且接近 200 个/ μ L 这一现象还是很值得我们注意。通常情况下我们认为 R5 嗜性的 SHIV 并不如 CXCR4 嗜性的病毒那样容易引起 CD4⁺T 细胞的耗竭^[4],尤其是在中国恒河猴中。1-1 出现这样的现象是何种因素造成的,还需要我们进一步的观察与分析。

与小剂量多次攻毒所产生的多载量峰值的现象不同,Lily 等^[6]人采用一次大剂量(10^{3.7} TCID₅₀ SHIV_{SF162p3})阴道攻毒后,4 只恒河猴病毒载量峰值都达到了 10⁶ copies/mL ~ 10⁸ copies/mL,其中两只猴病毒载量 set-point 值维持在 (10⁵ ~ 10⁷) copies/mL 直至死亡,它们的外周血 CD4⁺T 细胞绝对数也出现较明显的下降。尸检结果表明两只恒河猴均死于 SAIDS。这个结果从一个侧面说明了 SHIV_{SF162p3} 具有较强的致病性。

本次研究中,我们没有使用 NIH 提供的病毒的 TCID₅₀ 来进行中国恒河猴的 SHIV_{SF162p3} 的攻毒,而是使用中国恒河猴 PBMCs 进行了重新滴定。这样一方面了解了病毒对中国恒河猴 PBMCs 细胞的感染特性,同时也消除了运输途中,可能的温度变化导致病毒毒力的降低。在小剂量攻击的模型中,由于病毒剂量小,所以滴定的微小误差可能导致模型的成败。因此 TCID₅₀ 结果的准确对小剂量攻击模型来说是至关重要的。

SHIV_{SF162p3} 小剂量连续多次阴道感染模型除了可以较好的模拟 HIV-1 疾病过程,也很适合进行以

包膜为基础的疫苗效用可行性评估。当然,这并不意味着这一病毒无懈可击。由于 R5-SHIV_{SF162p3} 所包含的 HIV 片段为欧美流行株 HIV B 亚型片段,而目前中国 HIV 流行株绝大多数为 C 亚型^[7],所以这并不完全适合评价针对我国 HIV 流行特点设计的艾滋病疫苗。但是,通过对 R5-SHIV_{SF162p3} 的构建和生物学研究,为构建适合评价我国艾滋病疫苗的 SHIV 病毒提供了借鉴。

参考文献:

- [1] 刘秀英,丛喆,侯俊,等. 中国恒河猴 Mamu-A* 01 基因筛查及其对抗原肽 p11C 的特异性 CTL 反应[J]. 中国实验动物学报,2008,16(2):100-104.
- [2] 冯育芳,王卫,许琰,等. SIVmac251 不同途径感染恒河猴急性期实验研究[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(2):80-83.
- [3] 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.
- [4] 王卫,刘强,许琰,等. SHIV-KB9 感染中国恒河猴有效浓度的确定[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(2):67-71.
- [5] Harouse JM, Gettie A, Cheng-Mayer C, et al. Mucosal transmission and induction of simian AIDS by CCR5-specific simian/human immunodeficiency virus SHIVSF162P3 [J]. J Virol, 75(4):1990-1995.
- [6] Tsai L, Trunova N, Cheng-Mayer C, et al. Efficient repeated low-dose intravaginal infection with X4 and R5SHIVs in rhesus macaque: Implications for HIV-1 transmission in humans [J]. Virology, 2007, 362(1):207-216.
- [7] Wu Z, Sun X, Sullivan SG, et al. Public health. HIV testing in China [J]. Science, 2006, 312(5779):1475-1476.

(修回日期)2010-10-08



中国科技核心期刊 《中华临床医师杂志(电子版)》2011 年度征稿征订

《中华临床医师杂志(电子版)》是中国科技核心期刊,半月刊,全年出刊 24 期,定价 672 元,国内刊号 CN 11-9147/R,邮发代号 80-728,被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

2011 年度重点栏目征稿及 2011 年优惠征订详情请见中华临床医师杂志官方网站 www.clinicmed.net 的期刊动态。

欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志! 欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

投稿信箱:北京市 100035-50 信箱 编辑部 收 邮编 100035

投稿电子邮箱:Lcdactor@163.com

电话:010-62219211

传真:010-62222508

网址:www.clinicmed.net