



# SHIV-1157i 及衍生病毒的研究进展

金光, 丛喆, 王卫, 魏强

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 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】** C亚型是世界上流行的 HIV-1 主要亚型, 带有 HIV-1 C 亚型 env 区的 SHIV 和相应的非人灵长类模型是研究人类艾滋病的有效工具。SHIV-1157i 及其衍生病毒能够成功地通过黏膜途径感染恒河猴和猪尾猴, 并诱发艾滋病类似症状, 而且恒河猴缓慢的发病进程与人类感染 HIV-1 相似。因此, 掌握 SHIV-1157i 及其衍生病毒感染恒河猴的发病规律并探索其机制, 将对研究人类 HIV-1 感染和发病机制, 以及评价 HIV-1 C 亚型 env 区为靶点的艾滋病候选疫苗具有重要意义。

**【关键词】** SHIV-1157i; SHIV-1157ipd3N4; 恒河猴; 猪尾猴

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)05-0066-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2011.05.016

## Progress in Research on SHIV-1157i and Its Variations

JIN Guang, CONG Zhe, WANG Wei, WEI Qiang

(Key Laboratory of Human Disease 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 Union Medicine College, Beijing 100021, China)

**【Abstract】** Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) clade C is the most prevalent clade in the world, and simian-human immunodeficiency virus (SHIV) encoding HIV-1 clade C env and by which the nonhuman primates model is made are efficient tools for investigation of human acquired immune deficiency syndrome (AIDS). SHIV-1157i and variations from SHIV-1157i can successfully infect rhesus macaques and pig-tailed macaques via mucosa and causing symptoms like AIDS eventually, and the slow process of onset in the in vivo model of rhesus macaques resulted from these SHIVs is similar to HIV-1 infection from human being. Therefore, to elucidate the pathogenesis of infection of rhesus macaques by SHIV-1157i and its variations is of great significance for investigating HIV infection and pathogenesis in human being, and for development of candidate AIDS vaccines targeting HIV-1 clade C env.

**【Key words】** SHIV-1157i; SHIV-1157ipd3N4; Rhesus macaque; Pig-tailed macaque

自 1990 年日本京都大学的 Shibata 等人构建出首个嵌合的猴-人免疫缺陷病毒 (simian-human immunodeficiency virus, SHIV) 以来<sup>[1]</sup>, 基于各种 HIV (human immunodeficiency virus, HIV) 亚型所构

建的 SHIV 株已有数十种, 但目前大多数 SHIV 株所利用的 env 基因都源自 HIV-1 B 亚型。而 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, 尤其在撒哈拉沙漠以南非洲

[基金项目] “十一五”国家科技重大专项课题 (2009ZX10004-402, 2009ZX10004-307)。

[作者简介] 金光, 男, 硕士生, 研究方向: 实验动物病毒学。

[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: weiqliang0430@sohu.com。

和亚洲等获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 增长最快地区,因此现有的 SHIV 株没有反应出当前 HIV-1 流行趋势。另外,世界上超过 90% 的 HIV-1 感染与黏膜传播有关,包括性传播和母婴传播<sup>[2]</sup>。综上,一株能够通过黏膜传播的带有 HIV-1 C 亚型 env 区的 SHIV 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。

SHIV-1157i 及其衍生病毒是带有 HIV-1 C 亚型 env 区的 SHIV 株,这些病毒具有高度复制能力和单一 CCR5 受体嗜性,能够通过黏膜途径感染恒河猴和猪尾猴,并诱发 AIDS 类似症状,是研究 HIV-1 感染和发病机制及评价 AIDS 候选疫苗功效的有效工具。

### 1 SHIV-1157i 及其衍生病毒的构建

RM Ruprecht 小组从一个 6 个月大的赞比亚婴儿身上分离出 HIV-1157i,以 SHIV- $\nu$ pu<sup>+</sup> 构建了带有该 HIV-1 C 亚型 env 区的感染性分子克隆 SHIV-1157i,用 SHIV-1157i 转染 293T 细胞,培养上清静脉途径感染一只幼年印度恒河猴 (RPn-8),RPn-8 感染 123 周后发展为 AIDS (外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞数小于 200 细胞/ $\mu$ L)。从感染的动物体内分离出的病毒称为 SHIV-1157ip,而从发生 AIDS 后的动物体内分离出的病毒称为 SHIV-1157ipd。提取发病后动物的外周血单个核淋巴细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 中的基因组 DNA,设计特异引物来扩增 SHIV-1157ipd DNA 的 3' 端半长。同时,用限制性内切酶切下 SHIV- $\nu$ pu<sup>+</sup> 的 5' 端序列,然后克隆到 pSP73-N 载体中。再将 3' 端 PCR 产物克隆到已经含有 SHIV- $\nu$ pu<sup>+</sup> 5' 端的 pSP73-N 载体中,连接形成全长前病毒 DNA SHIV-1157ipd。在全部的 23 个克隆中,根据每个克隆的 293T 细胞转染上清在 TZM-bl 细胞中感染能力的不同,选定了感染能力最强的第 3 号克隆—SHIV-1157ipd3,它能够感染正常猴 PBMC<sup>[2]</sup>。

正常的 C 亚型 HIV-1 株长末端重复序列 (long terminal repeated, LTR) 有 3 个 NF- $\kappa$ B 结合位点。向 LTR 中插入额外的 NF- $\kappa$ B 结合位点可能会使病毒产生急性致死性变异,导致猪尾猴在几天内死亡,如 SIVpbj14,但也可能会从弱病毒的进化出致病能力更强的子代病毒,如 SIVmac239 $\Delta$ 3。另外,有人报道 NF- $\kappa$ B 结合位点的数量与由 LTR 驱动的基因表

达之间直接相关。RM Ruprecht 小组使用定向诱变方法在 SHIV-1157ipd3 的 LTR 中加入了一个 NF- $\kappa$ B 结合位点,得到了 SHIV-1157ipd3N4。同时,他们发现在 TNF- $\alpha$  存在的条件下,测出 SHIV-1157ipd3N4 比 SHIV-1157ipd3 在恒河猴 PBMC 感染上清中的 p27 抗原浓度更高,表明加入 NF- $\kappa$ B 结合位点后,病毒的复制能力增强。

### 2 病毒在印度恒河猴体内的传代

感染性分子克隆 SHIV-1157i 静脉感染了 RPn-8 后,采集其血液通过静脉途径在另外 4 只印度恒河猴体内快速传代。与 RPn-8 相比,传代的 4 只猴血浆病毒 RNA 载量峰值升高了 1~2 个数量级。在 RPn-8 发展成为 AIDS 后,采集其血液静脉感染了 RBg-9。RBg-9 的血浆病毒 RNA 载量峰值比 RPn-8 高约 2 个数量级,外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞数比 RPn-8 下降更快,最后也发展成了 AIDS。6 只动物都在感染病毒 2 周内出现起始的血浆病毒 RNA 载量峰值。4/6 的动物在感染病毒 123~270 周后都发展为 AIDS,且有 2 只发生机会性感染,包括一例猴病毒 40 (simian virus, SV40) 脑炎<sup>[3]</sup>。

### 3 SHIV-1157ipd3N4 外膜区的变异

RM Ruprecht 小组对 SHIV-1157i、SHIV-1157ip 和 SHIV-1157ipd3N4 进行序列分析显示,SHIV-1157ipd3N4 的 env 区序列出现的一些变化导致了 gp120 区的可变环 (V1-V4) 出现氨基酸替换,2G12 抗原核心位点之一的 N295 位氨基酸也发生替换,即 SHIV-1157ipd3N4 缺少 SHIV-1157i 所含有的结合单克隆中和抗体 2G12 的表位,这使 SHIV-1157ipd3N4 对 2G12 介导中和作用的敏感性降低。另外 SHIV-1157ip 和 SHIV-1157ipd3N4 在 gp41 区 3' 端有插入部分<sup>[2]</sup>。

SHIV-1157ipd3N4 的 env 区序列的变异可能是 RBg-9 出现更高的血浆病毒 RNA 载量峰值并最终发展为 AIDS 的原因,与以前报道的 SIV 衍生病毒在晚期具有更强复制能力和致病性的结果一致。另外,SHIV-1157ipd env 区全部 5 个克隆的 gp41 区序列 3' 端都出现了 118 个碱基的缺失,移码突变导致了 35 个氨基酸的缺失,但获得了 SIVmac239 gp41 区的 57 个氨基酸。这一改变与 SHIV89.6P 系列传代时 env 区的改变相似,但有一定区别。这些变化表示,SHIV-1157i 在感染恒河猴的过程中发生了显

著的变异。另外,序列分析显示,SHIV-1157i 感染的恒河猴在疾病进程中产生的 env 区变异能够基本反映出 HIV-1 env 区在感染婴儿体内的变异情况<sup>[4]</sup>。

此外, RM Ruprecht 小组还以 SHIV-1157ipd3N4 为骨架构建了 SHIV2873Ni, 这也是一株带有 HIV-1 C 亚型 env 区的 SHIV 毒株。SHIV2873Nip 对中和抗体敏感度比 SHIV-1157ipd3N4 更高,可能是由于 SHIV2873Nip 是在动物感染后约一年才再次分离得到,而后者是从一只已经感染病毒 2.7 年并发展成为 AIDS 的动物体内再分离的,很明显 SHIV-1157ipd3N4 是一株中和抗体逃逸的病毒<sup>[5]</sup>。

#### 4 SHIV-1157i 及其衍生病毒动物感染实验

感染性分子克隆 SHIV-1157i 静脉感染 RPn-8 后,采集血液静脉接种另外 5 只印度恒河猴,传代的动物血浆病毒 RNA 载量峰值升高了 1~2 个数量级。4/6 的动物发展为 AIDS,且有 2 只发生机会性感染<sup>[3]</sup>。这说明静脉途径感染 SHIV-1157i 能够使印度恒河猴感染甚至诱发 AIDS,并且病毒在印度恒河猴体内适应后复制能力增强。Shiv-Lok 等人使用 SHIV-1157ipd3N4 通过直肠途径一次性大剂量成功感染 4 只猪尾猴,感染病毒 2 周后平均血浆病毒 RNA 载量峰值  $7.6 \pm 5.8 \times 10^6$  copies/mL。另外,急性感染还导致十二指肠黏膜 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞大量丢失,CD4<sup>+</sup>T 细胞与 CD8<sup>+</sup>T 细胞比值显著下降,其中 1 只动物发展为 AIDS<sup>[6]</sup>。这说明直肠途径一次性大剂量感染 SHIV-1157ipd3N4 能够使猪尾猴感染甚至诱发 AIDS。4/6 的印度恒河猴和 1/3 的猪尾猴发展成为 AIDS,表明 SHIV-1157i 及其衍生病毒具有较强致病能力。猪尾猴在感染早期出现了剧烈的黏膜免疫发病过程,导致十二指肠黏膜 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞大量丢失,这也证实了肠道免疫症状是 R5 嗜性的 SIV/SHIV 在猪尾猴体内早期感染的标志这一观点。

RM Ruprecht 小组使用病毒浓度为  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL (TZM-bl 滴定)的 SHIV-1157ipd3N4 原液 1:10、1:50 和 1:60 稀释的病毒液能通过直肠途径感染印度恒河猴,1:100 稀释的病毒液使 1/2 的动物感染。SHIV-1157ipd3N4 原液、1:5 和 1:10 稀释的病毒液能通过直肠途径感染中国恒河猴,1:50 稀释的病毒液使 2/3 的动物感染,更高稀释度的病毒不能引发感染。5 只感染动物的血浆病毒 RNA 载量峰值在

$10^6$  copies/mL 以上<sup>[2]</sup>。SHIV-1157ipd3N4 原液 1:1、1:10、1:20 阴道途径成功感染 5 只印度恒河猴,1:50 和更高稀释度的病毒不能引发感染。5 只感染动物的血浆病毒 RNA 载量峰值在  $10^6$  到  $10^7$  copies/mL<sup>[7]</sup>。这说明直肠和阴道黏膜途径感染 SHIV-1157ipd3N4 能够使中国恒河猴和印度恒河猴感染,当感染剂量低于临界值时一次性感染的可能性大大降低,而且临界值大小根据感染途径和动物种类的不同而具有一定差异。

RM Ruprecht 小组使用 3.7 半数动物感染剂量 (animal infection dose 50%, AID<sub>50</sub>) SHIV-1157ipd 以口腔途径一次性感染印度恒河猴以尝试模拟乳汁传染,导致 4/5 的病毒对照组和 6/10 的疫苗组动物感染,感染动物 2 周内都出现了血浆病毒 RNA 载量峰值,绝大部分都在  $10^5$  copies/mL 以上。使用 20AID<sub>50</sub> SHIV-1157ipd3N4 以直肠途径一次性大剂量感染上述口腔途径中未感染的 5 只印度恒河猴和另一病毒对照组的 8 只印度恒河猴,除疫苗组 1 只动物外,14/15 的动物感染,血浆病毒 RNA 载量峰值在  $10^7$  copies/mL 以上<sup>[8]</sup>。这说明口腔和直肠黏膜途径感染 SHIV-1157i 或衍生病毒能够感染印度恒河猴,但根据感染途径和剂量的不同,血浆病毒 RNA 载量峰值具有一定差异,小剂量口腔途径感染产生的血浆病毒 RNA 载量峰值比大剂量直肠途径感染要低一到两个数量级,除剂量大小外,还可能与前者使用的 SHIV-1157ipd3 要比后者使用的 SHIV-1157ipd3N4 在复制能力上有差距有关。同样在直肠途径大剂量感染情况下,SHIV-1157ipd3N4 在中国恒河猴体内诱发的血浆病毒 RNA 载量峰值约为  $10^6$  copies/mL,与猪尾猴相近,但比印度恒河猴低了一个数量级。对于不同感染途径的比较发现,印度恒河猴不同部位黏膜对病毒的通透性不同,直肠感染需要的病毒剂量最小,其次是阴道,口腔需要的剂量最大,这与流行病学调查得出的人类不同途径感染 HIV-1 的风险相似。在黏膜无损伤的条件下,三种途径的易感性关系为直肠:阴道:口腔 = 33:7.6:1<sup>[7]</sup>。因此,血浆病毒 RNA 载量峰值的大小可能与感染剂量、感染途径、病毒株和动物种类的差异有关。另外, RM Ruprecht 小组还建立了口腔颊黏膜局部炎症的印度恒河猴模型,2/4 的口腔颊黏膜局部炎症动物感染而 4/4 的正常动物未感染。这表明炎症增加了动物对病毒的易感性,这可能与炎症区 CD4<sup>+</sup>的靶细胞数量增加有关。

## 5 结语

总之,虽然利用 SHIV-1157i 及其衍生病毒能够通过多种黏膜途径建立印度恒河猴、中国恒河猴和猪尾猴的模型,但相比恒河猴,猪尾猴更高血浆病毒载量和调定点以及感染早期十二指肠黏膜 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞剧烈的下降,说明其不如恒河猴更适合作为模拟人类 HIV-1 感染的动物模型。尽管 SHIV-1157i 及其衍生病毒不是第一个非 B 亚型 R5 嗜性的 SHIV,但之前没有任何一个非 B 亚型 SHIV 可以在恒河猴体内通过黏膜感染并导致 AIDS。虽然双嗜性的 SHIV 89.6P 和 CXCR4 嗜性的 SHIV 株都会诱发 AIDS,但同时也会诱导外周血 CD4<sup>+</sup> T 细胞快速的几乎也是不可逆的衰竭,这并不能反映出人类感染 HIV-1 的临床过程。因此,由 R5 嗜性的 SHIV-1157i 来源的病毒通过黏膜途径感染导致的恒河猴慢性 AIDS 进程更能反映人类 HIV-1 感染的方式和疾病进程,掌握 SHIV-1157i 及其衍生病毒感染恒河猴的发病规律并探索其机制,对研究人类 HIV-1 感染和发病机制及评价基于 HIV-1 C 亚型 env 区的疫苗功效具有重要意义。

### 参考文献:

[ 1 ] Shibata R, Sakai H, Kiyomasu T, et al. Generation and characterization of infectious chimeric clones between human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus from an African green monkey [J]. J Virol, 1990, 64: 5861

- 5868.

- [ 2 ] 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: 8729 - 8738.
- [ 3 ] Humbert M, Rasmussen RA, Song R, 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.
- [ 4 ] Tso FY, Hoffmann FG, Tully DC, et al. A comparative study of HIV-1 clade C evolution in a Zambian infant with an infected rhesus macaque during disease progression [J]. AIDS, 2009, 23: 1817 - 1828.
- [ 5 ] Siddappa NB, Song R, Kramer VG, et al. Neutralization-sensitive R5-tropic simian-human immunodeficiency virus SHIV-2873Nip, which carries env isolated from an infant with a recent HIV clade C infection [J]. J Virol, 2009, 83: 1422-4432.
- [ 6 ] Ho O, Larsen K, Polacino P, et al. Pathogenic infection of Macaca nemestrina with a CCR5-tropic subtype-C simian-human immunodeficiency virus [J]. Retrovirology, 2009, 6: 65.
- [ 7 ] Chenine AL, Siddappa NB, Kramer VG, et al. Relative transmissibility of an R5 clade C simian-human immunodeficiency virus across different mucosae in macaques parallels the relative risks of sexual HIV-1 transmission in humans via different routes [J]. J Infect Dis, 2011: 1155 - 1163.
- [ 8 ] Rasmussen RA, Ong H, Song R, et al. Efficacy of a multigenic protein vaccine containing multimeric HIV gp160 against heterologous SHIV clade C challenges [J]. AIDS, 2007, 21: 1841 - 1848.

(修回日期) 2010-10-27