



猴免疫缺陷病毒(SIV_{mac239})多次直肠暴露 对机体细胞免疫的影响

王卫,刘克剑,吴芳新,丛喆,陈霆,魏强

(北京协和医学院比较医学中心,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 研究猴免疫缺陷病毒(SIV_{mac239})多次直肠粘膜暴露对机体细胞免疫的影响。方法 建立小剂量多次直肠粘膜暴露模型,测定实验猴的血浆病毒载量了解病毒复制水平,测定外周CD4⁺T细胞绝对数了解疾病进展情况,测定T细胞亚群和外周单个核细胞IFN- γ 分泌情况了解机体细胞免疫状况。结果 小剂量SIV_{mac239}病毒多次暴露能导致病毒通过直肠粘膜进入动物体内,诱导机体免疫系统出现变化,但未见SIV_{mac239}典型感染。病毒多次直肠暴露诱导特异性细胞免疫,但与普通病毒感染相比,水平较低。结论 本研究明确了猴免疫缺陷病毒小剂量暴露对机体细胞免疫的作用,为HIV疫苗研究提供了基础信息。

【关键词】 SIV_{mac239};直肠;粘膜;暴露;细胞免疫

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 08-0001-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.008.001

Effect of repeated rectal exposure of low-dose simian immunodeficiency virus on the systemic cellular immunity in monkeys

WANG Wei, LIU Ke-jian, WU Fang-xin, CONG Zhe, CHEN Ting, WEI Qiang

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC) & Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State administration of Traditional Chinese medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of repeated rectal exposure of low-dose simian immunodeficiency virus on the systemic cellular immunity in monkeys. **Methods** Eight 3- to 4-year old rhesus macaques (*Macaca mulatta*) (male:female 1:1) were used in this study. The monkeys were inoculated with 10 TCID₅₀ SIV_{mac239} virus through rectum twice a week for consecutive 6 weeks to establish a multiple rectal exposure model of SIV_{mac239} virus infection. Then, plasma viral load, CD4⁺T cell count, T cell subsets and IFN- γ secretion of the experiment monkeys were determined. **Results** Low-dose SIV_{mac239} virus induced some changes in the immune system through the rectal mucosa, but didn't induce typical infection. Repeated rectal mucosal low-dose virus exposure can activate the cellular immune system. **Conclusions** This study defines the effect of repeated low-dose simian immunodeficiency virus exposure on the systemic cellular immunity, and provided basic information for HIV-1 vaccine research.

[基金项目] 国家科技重大专项课题(2012ZX10004501-001, 2013ZX10004608-003, 2012ZX10001006-003)。

[作者简介] 王卫(1981-),男,硕士,助理研究员,比较医学专业。

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

【Key words】 Simian immunodeficiency virus, SIV_{mac239}; Exposure; Rectal mucosa; Cellular immunity; Monkey

病毒具有致病性和免疫原性两面性,致病性指病毒具有的破坏寄主并诱发病害的特性,这是人们研发病毒疫苗的主要原因。而免疫原性是指病毒能够刺激宿主机体形成特异抗体或致敏淋巴细胞的能力,这也是病毒疫苗研发成功的理论基础。前期研究表明,HIV 病毒感染可产生抗 HIV 免疫应答,但却不能预防重复感染,说明 HIV 的免疫原性较弱^[1,2]。多次 HIV-1 病毒的暴露将刺激机体免疫反应,使其达到较高的免疫水平,但具体能达到多高的水平尚未明确。由于 HIV-1 病毒主要通过性接触传播,而且粘膜损伤和粘膜免疫在艾滋病的疾病进程发挥重要作用,因此,了解 HIV-1 病毒多次粘膜暴露对机体免疫反应就显得尤为重要。本研究使用 SIV_{mac239} 感染恒河猴模型,研究艾滋病毒小剂量多次直肠粘膜暴露对机体的刺激作用,明确艾滋病毒暴露诱发细胞免疫情况,为 HIV-1 疫苗研究提供基础信息。

1 材料和方法

1.1 实验动物

中国恒河猴 8 只,3~4 岁,3~5 kg,雌雄各半,购自北京协尔鑫生物资源研究所(合格证编号:SCXK(京)2010-0007)。实验前,经血清学间接免疫荧光抗体检查法(IFA)检查排除猴 B 病毒(BV)、猴免疫缺陷病毒(SIV)、猴逆转录 D 型病毒(SRV-1)和猴 T 淋巴细胞性 I 型病毒(STLV-1)等相关病原体的感染。本实验经过本单位实验动物管理和使用委员会(IACUC)的动物伦理审查,批准号为 IACUC-MC-12-6005。恒河猴随机分成两组,分别为小剂量多次组和大剂量一次组,每组 4 只动物。

1.2 毒株及动物接种

SIV_{mac239} 病毒由美国 Aaron Diamond 艾滋病研究中心 Marx 博士惠赠,由本实验室扩增和保存^[3,4]。具体的动物接种计划:小剂量多次组四只

动物通过直肠途径接种 1 mL 含 10 TCID₅₀ SIV_{mac239} 的病毒液,每周两次,共接种 12 次(6 周),实验前及每次病毒接种前采集动物静脉血,见图 1。大剂量一次组四只动物使用 5×10^4 TCID₅₀ SIV_{mac239} 直肠接种,后按时采集动物静脉血进行检测。病毒具体接种方法为:动物保持俯卧位,缓慢将病毒液注入肛窦处,保持俯卧位半小时。

1.3 临床观察及样品采集

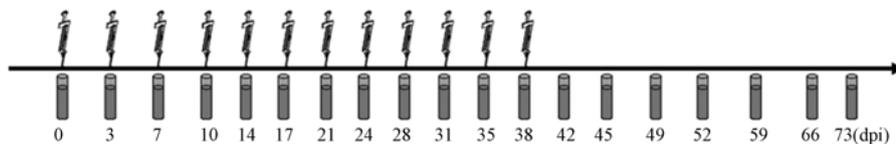
每天观察实验动物临床症状,包括精神状态、活动情况、摄食量、皮毛以及粪便形态等。每 3~4 d 采集恒河猴外周血,监测其血浆病毒载量、CD4⁺ T 细胞数、T 淋巴细胞亚群以及外周单个核细胞(PBMC)IFN- γ 的分泌情况变化等。

1.4 血浆病毒载量测定

TRIzol 法提取血浆中病毒 RNA,使用 ABI 7500 实时定量 PCR 仪和 TaqMan RNA-to-CT 1-Step Kit (ABI, Cat No. 4392938) 测定血浆病毒 RNA 载量。总反应体系为 20 μ L,灵敏度为 10² copies/mL。其中上游引物为 gag91F(5'-GCA GAG GAG GAA ATT ACC CAG TAC-3'),下游引物为 gag91R(5'-CAA TTT TAC CCA GGC ATT TAA TGT T-3'),探针为 pSHIVgag91-1(5'-FAM ACC TGC CAT TAA GCC CGA-MGB-3')^[5,6]。反应体系内含: TaqMan RT-PCR Mix (2 \times) 10 μ L; TaqMan RT Enzyme Mix (40 \times) 0.3 μ L; 引物 gag91F 和 gag91R (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L; 探针 pSHIVgag91-1 (1 μ mol/L) 0.3 μ L; DEPC H₂O 3.4 μ L; 模板 5 μ L。反应条件为: 48 $^{\circ}$ C 30 min (\times 1), 95 $^{\circ}$ C 10 min (\times 1), 94 $^{\circ}$ C 15 s (\times 40), 60 $^{\circ}$ C 60 s (\times 40)。

1.5 流式细胞术

取 50 μ L 的 EDTA 抗凝血,依次加入待标记抗体 PE-CY7-CD3、PERCP-CY5.5-CD4、APC-CY7-CD8、PE-CD28、APC-CD95,室温避光作用 15 min,全血检测管加入终浓度 10% 的红细胞裂解液,4 $^{\circ}$ C 作



注:病毒攻击,血样采集。

图 1 小剂量多次组恒河猴直肠粘膜多次病毒暴露示意图

Note. Virus inoculation; blood sample collection.

Fig. 1 The schematic diagram of multiple exposure with SIV_{mac239} to the Chinese rhesus by rectal inoculation

用 10 min。洗涤 2 次,细胞重悬于 500 μ L 的 pH 7.2 PBS 中, BD FACS-Canto 仪上分类计数^[6]。

1.6 IFN- γ ELISPOT

IFN- γ ELISPOT 方法使用的是商品化的试剂盒 (U-Cytech Biosciences, CT1262T20, Monkey ELISPOT kit, Lot # 65220245)。预先用抗猴 IFN- γ 抗体包被 96 孔平板, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 后用含 0.05% 吐温 20 的 PBS (PBST) 洗板。加入含 1% BSA 的 PBS 200 μ L 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。用 Ficoll 密度梯度离心法分离猴 PBMCs, 计数并用无血清培养液调整细胞浓度为 3×10^6 /mL, 将 PBMC 加入封闭好的 96 孔板孔中, 每孔加入细胞液 100 μ L, 并加入 5 ng/well 浓度的多肽刺激, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱孵育 24 h 时。孵育结束后, 把细胞液倒出, 用 200 μ L 的冰冷的去离子水处理, 后用 PBST 洗板 10 次, 之后, 先后加入生物素化的检测抗体和 GABA 结合的抗生物素抗体孵育 37 $^{\circ}$ C 1 h。孵育结束后, 用 PBST 洗板 5 次。后加入底物室温显色 15 ~ 20 min, 显色完毕, 用蒸馏水洗板两次, 干燥, 避光保存。阴性对照孔有 PBMCs 不加入多肽, 阳性对照孔用 50 ng/mL PMA + 1 μ g/mL ionomycin 刺激。做好的 ELISPOT 板通过倒置显微镜和 ELISPOT 读卡仪读板计数。最后, 计算所做复孔的平均值^[7]。

1.7 数据分析

流式数据使用 Flowjo version 7.2 进行分析, 作图及统计分析由 Graphpad Prism 5.0 完成。

2 结果

2.1 血浆病毒载量结果

8 只动物分为小剂量多次组和大剂量单次组, 分别接种 SIVmac239 病毒。实验猴在接受病毒接种

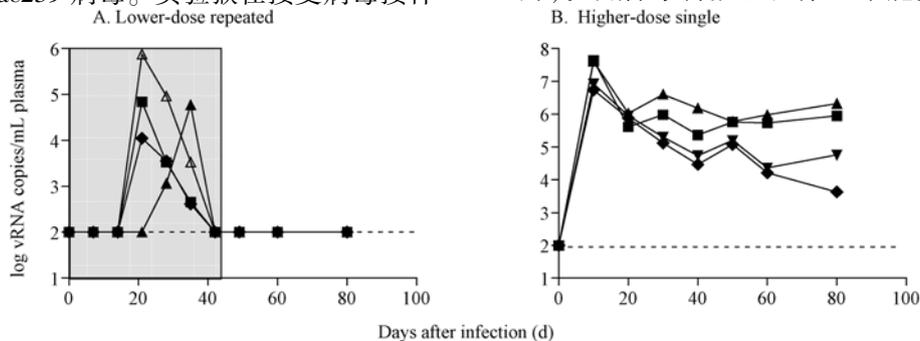
的同时, 使用 real-time RT-PCR 方法检测实验动物外周血病毒载量, 结果显示: 小剂量多次组动物在病毒接种期间出现血浆病毒载量, 部分时间点出现病毒载量阳性, 但多为一过性病毒血症, 而且病毒复制水平有限, 最高接近 10^6 copies/mL, 在病毒接种期后两个月的观察期内未检测出病毒载量阳性, 见图 2A; 而大剂量单次组动物出现典型的 SIVmac239 病毒感染情况, 病毒载量上升迅速至 10^6 copies/mL 以上, 而且维持较高的平台载量 ($10^4 \sim 10^5$ copies/mL), 见图 2B。前病毒 DNA 检测也验证了病毒载量结果 (数据未显示)。

2.2 外周 CD4⁺ T 细胞数

为了解小剂量病毒多次暴露对动物外周 CD4⁺ T 细胞的影响, 使用流式细胞术检测动物外周血 CD4⁺ T 细胞情况。结果显示, 在病毒刺激粘膜的同时, 小剂量多次组动物外周 CD4⁺ T 细胞数出现较为剧烈的变化, 但未出现明显下降, 甚至部分动物出现上升情况; 在病毒接种期后两个月的观察期内, 外周 CD4⁺ T 细胞数出现缓慢下降趋势, 见图 3A。而大量剂量一次组动物在病毒接种后迅速下降, 并维持于较低水平 (500 ~ 1 000 个/ μ L), 见图 3B。说明, 病毒小剂量刺激粘膜能进入动物体内, 诱导 CD4⁺ T 细胞的损耗, 但可能由于免疫反应的存在, CD4⁺ T 细胞损耗的速度较慢。

2.3 记忆 T 细胞亚群动态分析

为进一步了解小剂量多次组动物记忆 T 细胞亚群动态, 本研究使用流式细胞术分析动物外周血 T 细胞亚群的变化趋势, 包括 naive T 细胞 (T_N)、中心记忆 T 细胞 (T_{CM}) 和效应记忆 T 细胞 (T_{EM})。结果表明, 在粘膜刺激过程中, CD4⁺ 和 CD8⁺ T_N 逐渐上升, 说明病毒刺激了机体 T 细胞更新; CD4⁺ T_{CM}



PS: 阴影部分为病毒接种期

图 2 血浆病毒载量结果

PS: Shadow area indicates viral inoculation period.

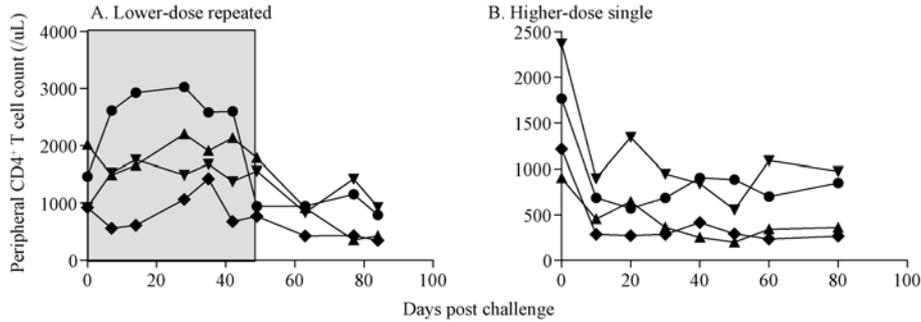
Fig. 2 The plasma viral load measurements

被病毒感染逐渐消耗,效应性 CD8⁺ T_{EM}也是逐渐下降;CD4⁺ T_{EM}和 CD8⁺ T_{CM}只是在病毒接种期间有升高。从整个趋势来看,病毒多次粘膜暴露能有效的刺激 T 细胞亚群,产生相应变化(图 4)。

2.4 PBMC IFN-γ 分泌情况

为了解病毒暴露对机体的影响,本研究使用 IFN-γ ELISPOT 方法检测动物细胞免疫水平,总体来看动物细胞免疫都出现两次峰值,小剂量多次组

峰出现在 28 dpi 和 56 dpi,而大剂量一次组出现在 30 dpi 和 126 dpi,可见细胞免疫的开始诱导时间为接近,但免疫成熟时间差异较大。此外,从免疫强度来看,每只动物均检测出特异的细胞免疫反应,但每组动物的结果都显示很大差异,小剂量多次组动物明显小于大剂量一次组动物,包括初次诱导和成熟阶段。说明,小剂量病毒粘膜暴露能刺激机体的细胞免疫反应,但强度较小(图 5)。



PS: 阴影部分为病毒接种期

图 3 外周 CD4⁺ T 细胞计数结果

PS: Shadow area indicates viral inoculation period.

Fig. 3 The results of peripheral CD4⁺ T cell count

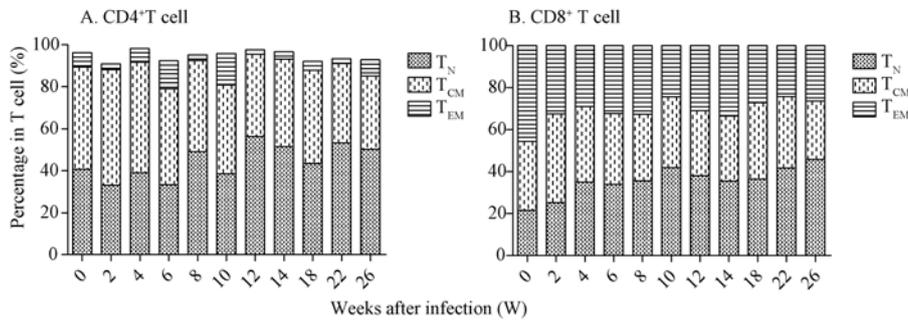


图 4 实验猴记忆 T 细胞动态分析

Fig. 4 Dynamic analysis of the monkey memory T cells

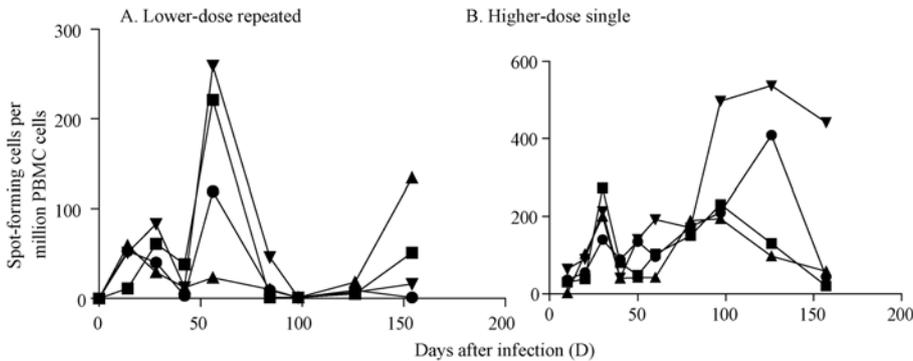
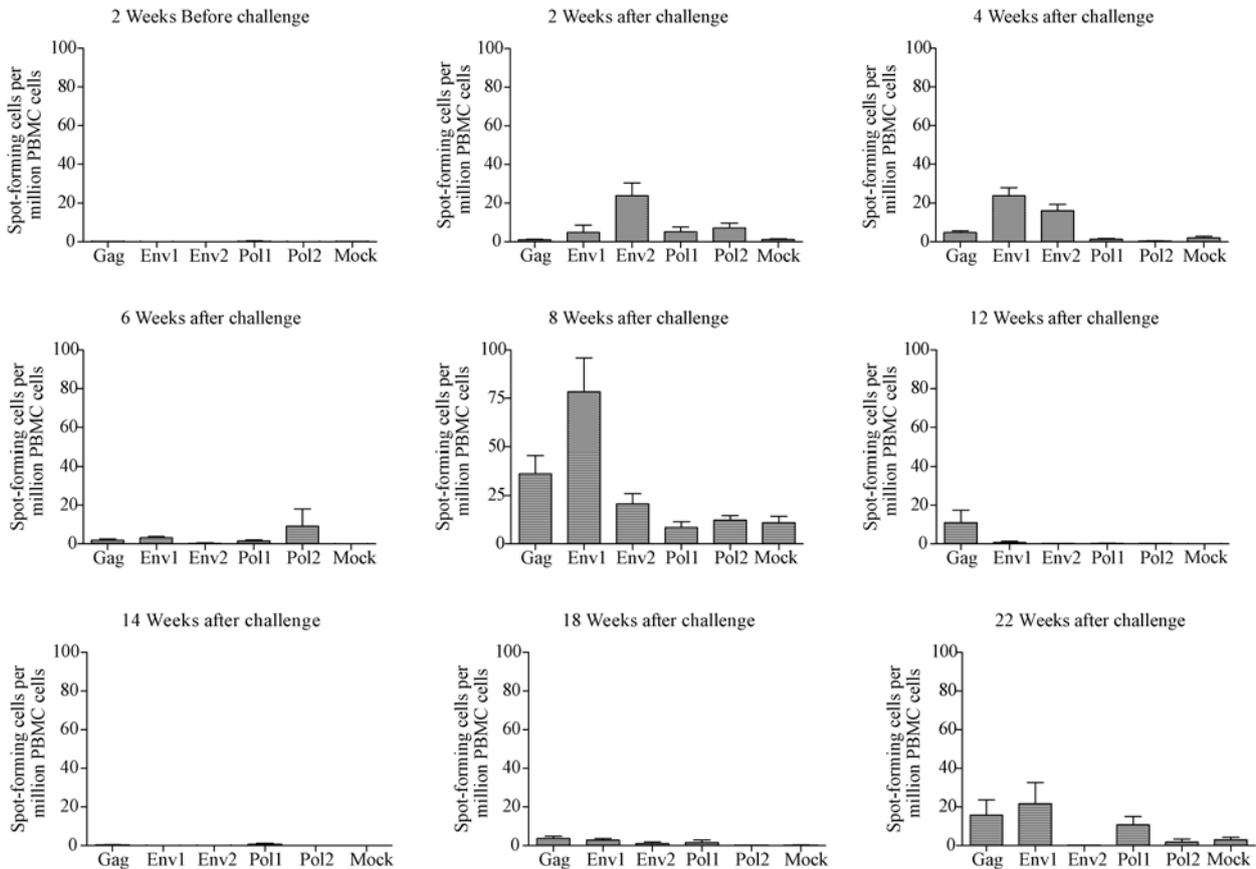


图 5 实验猴 PBMC IFN-γ 分泌情况

Fig. 5 Dynamic analysis of the IFN-γ secretion of PBMCs

图 6 IFN- γ ELISPOT 实验结果Fig. 6 Results of the IFN- γ ELISPOT assay

在此基础上,本研究还对诱发小剂量多次组动物细胞免疫的多肽片段进行了分析。结果显示,感染之初大部分时间点以针对 Env 的细胞免疫最强,这与 Env 位于病毒表面有关,但到后期针对 Env 的细胞免疫开始下降,可能与病毒包膜的高变异率有关;到 12 周之后,针对 Gag 的细胞免疫开始上升,这应该与 Gag 是病毒的保守核心有关。在这个过程中,针对 Pol 的细胞免疫均较弱,可能是由于病毒 pol 基因的变异程度较大有关(图 6)。

3 讨论

在 HIV 研究中,艾滋病毒多次暴露能降低病毒感染的机率是肯定的,但艾滋病毒暴露抑制感染的保护机制陷入了争议。研究表明,活化的免疫系统应该能够通过中和抗体,抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC),尤其是抗病毒的 CD8⁺ T 细胞(CTL)清除或抑制宿主病毒的感染。Haase 等^[8]人研究表明,宿主中产生的抗病毒抗体可能防止艾滋病毒的感染;Barker 等^[9]人研究表明,CD8⁺ T 细胞能建立 PBMC 的抵抗力以致阻止宿主的再次感染。

Yeh 等人研究表明,细胞免疫水平和体液免疫水平与重复感染没有相关性,推测其他免疫作用可能参与了超感染的保护作用,天然免疫系统的作用也应该被考虑在内^[10]。

由于 HIV 的种属特异性,目前缺乏 HIV 感染动物模型,常用的艾滋病动物模型为 SIV 感染模型和猴-人免疫缺陷病毒(SHIV)感染模型。鉴于 SHIV 病毒为人工改造病毒,本研究选择 SIV 病毒进行动物免疫接种。根据本实验室前期工作经验,选择 10 TCID₅₀ 作为免疫剂量,一方面避免了大剂量病毒迅速感染动物,另一方面可确保有足够的病毒影响动物,刺激机体反应。

本研究中,使用 SIVmac239 病毒小剂量多次直肠粘膜暴露,不断刺激机体免疫,使其达到较高水平,并与正常感染猴进行比较。血浆病毒载量未见典型感染症状,说明病毒多次暴露刺激机体产生了部分保护作用,抑制后续病毒感染和复制。CD4⁺ T 细胞数也未见急性期的急剧下降,说明前期病毒暴露阻止了后期病毒的急性感染。但其具体作用机制不明。

T 淋巴细胞是机体免疫系统的重要组成成分,根据其分化、归巢、表面分子及功能的不同,可分为 naïve T 细胞(T_N)、中心记忆 T 细胞(T_{CM})和效应记忆 T 细胞(T_{EM})三种,其中 $CD4^+ T_{CM}$ 是艾滋病病毒的主要靶细胞,其与艾滋病的疾病进程、病毒复制等密切相关, $CD4^+ T_N$ 是 $CD4^+ T_{CM}$ 主要分化源泉; $CD8^+ T_{EM}$ 是主要的效应杀伤细胞。在本研究中,为进一步探索是否这种隐匿性感染还能诱发疾病进展,本研究检测了动物的 $CD4^+ T_{CM}$ 细胞,结果该细胞群逐渐下降,说明这种隐匿性感染仍存病毒和机体的相互斗争,而且病毒仍占据上风,导致病毒靶细胞 $CD4^+ T_{CM}$ 和效应 $CD8^+ T_{EM}$ 细胞显下降趋势,但在一年的观察期内动物均维持健康状况,说明动物显慢性进展型。

此外,为了解病毒多次粘膜暴露对细胞免疫状态的影响,使用 IFN- γ ELISPOT 方法测定动物细胞免疫状况,发现针对病毒核心 Gag 的细胞免疫最强,但整体而言,病毒多次暴露在病毒接种期间和之后的细胞免疫均较弱,这可能是由病毒复制水平低,免疫原不多导致,也可说明病毒抑制与细胞免疫的压制关系不大。因此,需要进一步探索其他免疫机制对病毒复制抑制的作用。

参考文献:

- [1] Blish CA, Dogan O C, Jaoko W, et al. Association between cellular immune activation, target cell frequency, and risk of human immunodeficiency virus type 1 superinfection [J]. J Virol. 2014, 88(10): 5894 - 5899.
- [2] Redd AD, Quinn TC, Tobian AA. Frequency and implications of HIV superinfection [J]. Lancet Infect Dis. 2013, 13(7):622 - 628.
- [3] 吴芳新, 王卫, 刘克剑, 等. 猴艾滋病急性期肠粘膜相关淋巴组织 NK 细胞表型及功能 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(6):37 - 42.
- [4] 吴小闲, 张奉学, 何伏秋, 等. 猴免疫缺陷病毒 (SIV) 慢性感染猴模型的建立 [J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(4): 355 - 357.
- [5] Hofmann-Lehmann R, Swenerton RK, Liska V, et al. Sensitive and robust one-tube real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to quantify SIV RNA load: comparison of one-versus two-enzyme systems [J]. AIDS Res Human Retroviruses, 2000, 16(13):1247 - 1257.
- [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] 王卫, 冯育芳, 许琰, 等. ELISPOT 方法检测 SIVmac239 感染猴特异性细胞免疫水平 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9):39 - 43.
- [8] Haase AT, Henry K, Zupancic M, et al. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue [J]. Science, 1996, 274(5289):985 - 989.
- [9] Barker E, Bossart KN, Locher CP, et al. $CD8^+$ cells from asymptomatic human immunodeficiency virus-infected individuals suppress superinfection of their peripheral blood mononuclear cells [J]. J Gen Virol, 1996, 77(Pt 12):2953 - 2962.
- [10] Yeh WW, Jaru-Ampompan P, Nevidomskyte D, et al. Partial protection of simian immunodeficiency virus (SIV)-infected rhesus monkeys against superinfection with a heterologous SIV isolate [J]. J Virol, 2009, 83(6):2686 - 2696.

[修回日期] 2014-05-27