

CXCR4 嗜性 SHIVKU-1 病毒静脉感染 中国恒河猴初步研究

丛 喆, 蒋 虹, 苏爱华, 王 卫, 陈 霆, 薛 婧, 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 了解 SHIVKU-1 静脉途径感染中国恒河猴的感染特点及进展规律。方法 两只健康中国恒河猴, 静脉感染 SHIVKU-1 病毒, 定期采样检测血浆病毒载量、CD4⁺/CD8⁺ 比值、CD4⁺ T 细胞绝对数变化和血清中抗 SHIVKU-1 特异性 IgG 抗体水平。多色流式技术分析外周血、腹股沟淋巴结和十二指肠粘膜固有层 CD4⁺ T 淋巴细胞记忆细胞亚群变化。结果 两只实验猴成功感染 SHIVKU-1 病毒, 一直到感染后 3 个月均保持稳定水平的病毒载量。外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞下降明显, CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值严重倒置。CD4⁺ Tem 细胞比例在经历了感染早期的下降后, 大幅升高, 尤其是外周血和淋巴结。CD4⁺ Tem 则在粘膜固有层中增加明显。结论 SHIVKU-1 静脉途径成功感染了中国恒河猴, 为 SHIV/中国恒河猴疾病及评价模型的建立奠定了良好的基础, 为今后使用此模型评价抗病毒药物或疫苗提供了条件。

【关键词】 SHIVKU-1; CXCR4; 中国恒河猴; CD4⁺ 中心记忆性 T 细胞

【中图分类号】 R512.91; R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013)06-0053-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.006.012

Characterization of a Chinese-origin rhesus macaque model of X4-tropic pathogenic SHIVKU-1 infection by intravenous injection

CONG Zhe, JIANG Hong, SU Ai-hua, WANG Wei, CHEN Ting, XUE Jing, 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 study the characteristics of SHIVKU-1 infection in Chinese rhesus macaques and provide an animal platform in evaluation of the effectiveness of anti-HIV-1 drugs or vaccines with SHIVKU-1/rhesus animal model. **Methods** Two healthy Chinese-origin rhesus macaques, serum negative to SIV, SRV and STLV-1, were infected with SHIVKU-1 intravenously. CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets including memory CD4⁺ T cell subset in the peripheral blood (PBL), inguinal lymph nodes (ILN), and intestinal lamina propria (LP) were analyzed by flow cytometry. Viral load was detected by real time RT-PCR, so was the specific IgG antibody titer against SHIVKU-1 in the plasma using ELISA. **Results** Both of the two rhesus macaques established systemic infection, keeping steady viral load in 3 months after infection. The monkey G1302V died 457 days post-infection. Peripheral CD4⁺ T lymphocytes decreased significantly

【基金项目】 国家十二五科技重大专项课题 (编号: 2012ZX10004-501)。

【作者简介】 丛喆 (1972 -), 女, 研究方向: 实验动物病毒分子生物学和模型研究工作。E-mail: zhengyihan@yahoo.com。

【通讯作者】 魏强 (1964 -), 男, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@sohu.com。

post-infection, while the $CD4^+/CD8^+$ ratio went upside down. The proportion of $CD4^+$ Tcm cells experienced a decline in the early stage of infection and rose sharply, especially in the peripheral blood and lymph nodes. $CD4^+$ Tem increased significantly in the intestinal lamina propria. **Conclusions** A Chinese rhesus macaque model of SHIVKU-1 infection is successfully established by intravenous injection. It provides a choice to evaluate the efficiency of candidate vaccines or drugs aiming at the X4 tropic HIV, and for the pathogenesis studies as well.

【Key words】 SHIVKU-1; CXCR4; Chinese-origin rhesus macaques; $CD4^+$ Tcm

SHIVKU-1 是 SHIV-HXBc2 经恒河猴和猪尾猴系列传代得到的一株 SHIV 强毒株,它具有 CXCR4 嗜性,能在短期内引起感染猴外周血 $CD4^+$ T 细胞的耗竭,继而导致实验猴发病甚至死亡^[1-3]。本研究利用该病毒株静脉途径感染了两只中国恒河猴,以期了解和掌握该病毒感染中国恒河猴的感染规律和疾病进程,明确感染猴病毒学和免疫学等方面的变化,为今后应用此模型研究艾滋病的发病机制、传播、感染免疫和测试疫苗药物奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康中国恒河猴 2 只,购自北京协尔鑫生物资源研究所 [SCXK(京) 2005-2005],体重(3 ± 0.5) kg,编号分别为 G1301V、G1302V。经间接免疫荧光法(IFA)检测排除相关慢病毒(SIV、SRV-1、STLV-1)感染。动物饲养及相关实验在 ABSL-3 实验室中进行 [SYXK(京) 2009-0003],IACUC 批准号为 ILAS-AL-2011-006。

1.2 SHIVKU-1 毒株及感染

SHIVKU-1 由 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program 提供 (Cat # 3441, Dr. Opendra Narayan and Dr. Sanjay Joag 惠赠), $10^{3.75}$ TCID₅₀/mL。猴 G1301V 和 G1302V 经后肢静脉接种 0.4 mL 病毒原液。

1.3 组织细胞取材和预处理

1.3.1 外周血:感染前及感染后按计划采集实验猴 EDTA 抗凝血进行病毒及免疫指标检测。

1.3.2 淋巴结采集及细胞分离:感染前及感染后 14、28、56 及 84 d,新鲜采集腹股沟淋巴结,去除包膜后剪碎,置于细胞筛上(BD, Cat# 352350)轻轻研磨,用 5% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基冲洗,收集细胞悬液。调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL。

1.3.3 肠道组织采集及细胞分离^[4]:使用 Olympus 内窥镜(型号 GIF-160)及配套设备,在十二指肠降段取 4-6 块肠粘膜组织。将新鲜组织样本置于细胞筛上轻轻研磨,用 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养

基冲洗,收集细胞悬液。调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL。

1.4 流式抗体检测

EDTA 抗凝全血和新鲜制备的淋巴细胞用于流式抗体检测。取 50 μ L 的 EDTA 抗凝血或淋巴细胞悬液(10^6 个/50 μ L),依次加入待标记抗体 PE-cy7-CD3 (BD, Cat # 557749)、percp-Cy5.5-CD4 (BD, Cat # 552838)、APC-cy7-CD8 (BD, Cat # 557760)、PE-CD28 (Biolegend, Cat # 302908)、APC-CD95 (Biolegend, Cat # 305612),利用 CD28 和 CD95 检测记忆细胞亚群。室温避光作用 15 min (15 min 后,全血检测管需另加入终浓度 10% 的红细胞裂解液,4℃作用 10 min),洗涤 2 次,细胞重悬于 500 μ L 的 pH 7.2 PBS 中,BD FACS-CANTO 流式仪上分类计数^[4]。

1.5 SHIVKU-1 感染恒河猴外周血病毒载量的检测

TRIzol 法提取血浆中病毒 RNA,使用 ABI 7500 实时定量 PCR 仪,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 10^2 copies/mL。其中上游引物为 gag91 for, 5'-GCAGAGGAGGAAATTACCCAGTAC-3',下游引物为 gag91 rev, 5'-CAATTTTACCCAGGCATTTAATGTT-3',探针为 pSHIVgag91-1, 5'-FAM-ACCTGCCATTAAGCC CGA-MGB 3'-^[5]。反应体系内含: TaqMan® RT-PCR Mix (2 ×) 10 μ L; TaqMan® RT Enzyme Mix (40 ×) 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℃ 30 min (×1), 95℃ 10 min (×1), 94℃ 15 s (×40), 60℃ 60 s (×40)。

1.6 SHIVKU-1 感染恒河猴外周血抗 SHIVKU-1 IgG 抗体水平测定

SHIVKU-1 全病毒颗粒作为抗原,经 1:10 稀释后包被 ELISA 板,每孔 100 μ L。待检血清 56℃ 水浴 30 min 灭活后系列稀释,加到抗原孔中,同时做阴

性血清和空白对照。HRP-anti-monkey-IgG 1:5000 稀释, 37℃ 孵育 1 h 后, TMB 显色 15 min。以待检血清与特异性抗原反应的 A 值/阴性对照血清与特异性抗原反应的 A 值 ≥ 2.1 作为标准判定结果。

2 结果

2.1 临床症状

G1301V 号猴在长期感染过程中, 健康状况良好, 无典型感染症状。G1302V 号猴在感染前期状态良好, 但自感染 350 d 后精神逐渐萎靡, 长期慢性腹泻, 于感染后 457 d 死亡。

2.2 SHIVKU-1 感染中国恒河猴血浆病毒载量变化

两只实验猴都在感染后第 4d 就检出了血浆病毒载量, 其后一直在 1.0×10^4 copies/mL 左右波动, 没有出现明显的载量高峰(图 1)。

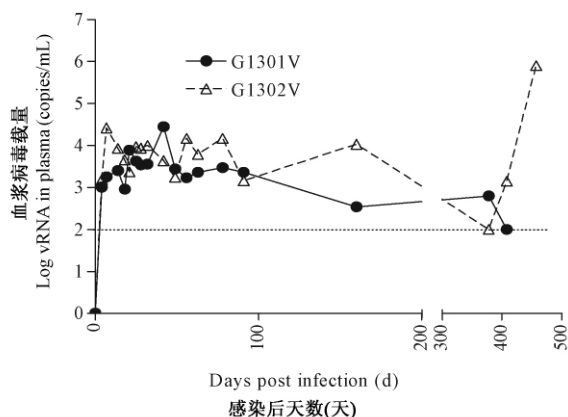


图 1 SHIVKU-1 静脉感染中国恒河猴外周血病毒载量结果

Fig. 1 Viremia (viral RNA copies/mL plasma) in the Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIVKU-1

2.3 SHIVKU-1 感染中国恒河猴 CD4⁺ T 细胞亚群变化

两只猴外周血 CD4⁺ T 细胞比例在感染后都有一个下降过程。G1301V 在感染后的 3 周内从感染前的 55.3% 下降到 18.3%, 短暂徘徊后持续上扬, 至 3 个月, 已基本恢复至初始水平, 达到 50%; G1302V 感染前与 G1301V 基本持平, 在 50% 左右, 感染后 3 周降至 7%, 其后虽有小幅上涨, 但始终在 20% 以下。之后逐渐降低, 至感染后 400 d 已降至 0.6%。在腹股沟淋巴结二者变化趋势相仿。感染前 G1301V 的 CD4⁺ T% 为 60%, G1301V 为 40%。

感染 4 w 后降至最低点, 分别为 40% 和 10%, 其后均有小幅上扬, 3 个月后维持在 50% 和 20% 左右。感染前两只猴的 CD4⁺ T% 在十二指肠粘膜固有层水平相差不大, 基本在 30% 上下, 感染后变化趋势与淋巴结基本相同, 最终分别为 26% 和 12%。

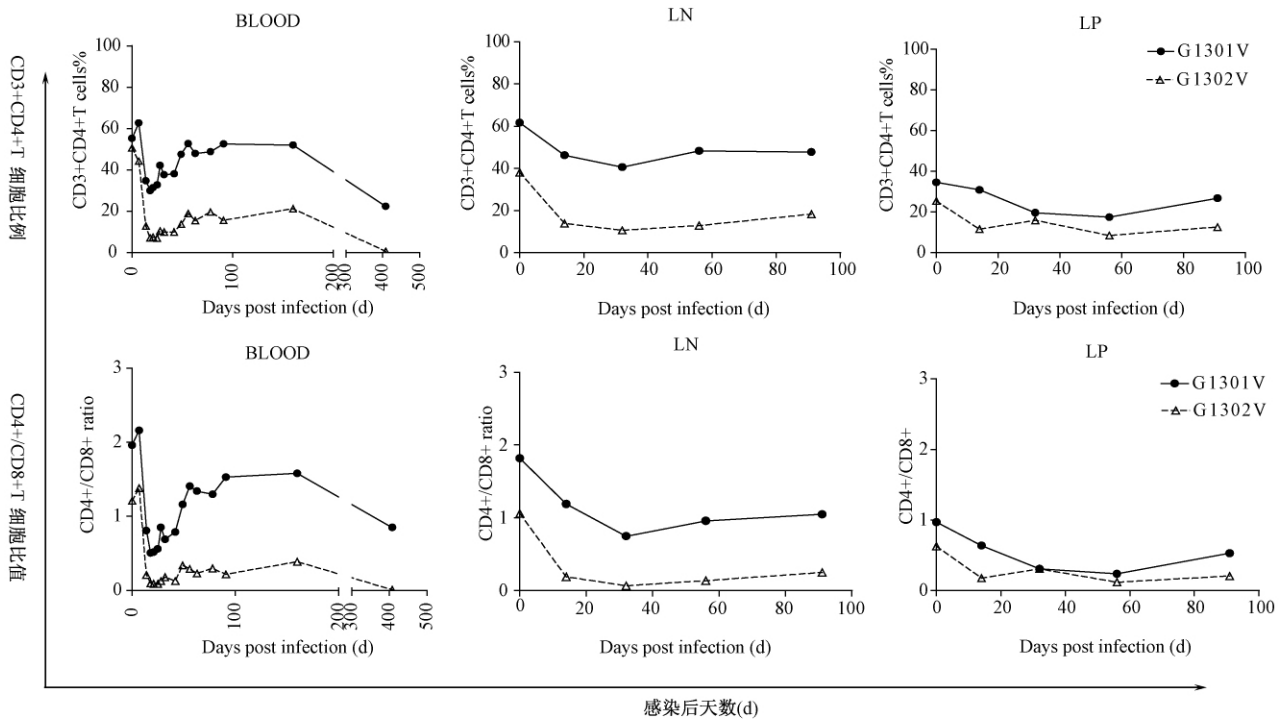
CD4⁺/CD8⁺ 比在不同组织的变化趋势与 CD4⁺ T% 基本相同。感染后外周血中 CD4⁺/CD8⁺ 都有一个明显下降过程。G1301V 在感染后的 3 周内从感染前的 1.96 下降到 0.50, 短暂徘徊后持续上扬, 至 3 个月, 已基本恢复至初始水平, 达到 1.53; G1302V 感染前 1.21, 感染后 3 周降至 0.1, 其后稳定在 0.2 左右, 至感染后 400 d 下降接近 0。感染前二者在腹股沟淋巴结分别为 1.82 和 1.06。感染 4 w 后降至最低点, 分别为 0.75 和 0.07, 其后均有小幅上扬, 3 个月后维持在 1.05 和 0.25 左右。感染前两只猴在十二指肠粘膜固有层分别为 0.97 和 0.63, 感染后变化趋势与淋巴结基本相同, 最终分别为 0.53 和 0.21(图 2)。

2.4 SHIVKU-1 感染中国恒河猴 T 细胞亚群绝对数变化

两只猴 G1301V 和 G1302V 在 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞绝对数上变化基本相同。感染后外周血 CD4⁺ T 细胞数迅速下降, 3 w 后分别从感染前 990 个/mL、1300 个/mL 下降到最低点 420 个/mL 和 76 个/mL, 其后基本保持水平, 3 个月时为 590 个/mL 和 180 个/mL。G1302V 在感染后期一直维持在 100 个/mL 以下。感染后两只猴外周血 CD8⁺ T 细胞水平基本与感染前保持稳定, 只在感染后 3 w 有短暂升高, 分别达到 1200 个/mL 和 1650 个/mL, 其后恢复至感染前水平(图 3)。

2.5 SHIVKU-1 感染中国恒河猴 CD4⁺ T 记忆细胞亚群变化

G1301V 外周血 CD4⁺ 中心记忆细胞 (CD4⁺ Tcm) 在感染初期有一个短暂下降, 从感染前的 63.8% 下降到 14 d 的 37.1%, 随后逐渐上涨, 至 91 d 时达到 90.8%; G1302V 则一直维持恒定, 基本保持在 40% 左右。伴随着 CD4⁺ Tcm 细胞的下降, CD4⁺ Tem 细胞在感染后逐渐上升。一个月内分别从感染前的 3.93% 和 1.80% 上升到 10-20% 之间, 后期逐渐下降, 至 91 d 时为 3.43% 和 6.01%。淋巴结、肠道粘膜固有层中 CD4⁺ Tcm 和 CD4⁺ Tem 细胞变化趋势基本相同。感染前期, 伴随着 CD4⁺ Tcm 的下降, CD4⁺ Tem 细胞比例均上升, 尤其是固有层



注: Blood: 外周血 LN: 腹股沟淋巴结 LP: 十二指肠粘膜固有层。

图2 SHIVKU-1 感染中国恒河猴不同组织中 CD4⁺ T 细胞比例和 CD4⁺/CD8⁺ 比值变化

Note: Blood: Whole peripheral blood; LN: Inguinal lymph nodes; LP: Duodenal biopsy specimens.

Fig. 2 Changes of the percentage of CD4⁺ T lymphocytes and CD4⁺/CD8⁺ ratio in different tissues in the Chinese-origin rhesus macaques infected with SHIVKU1 intravenously

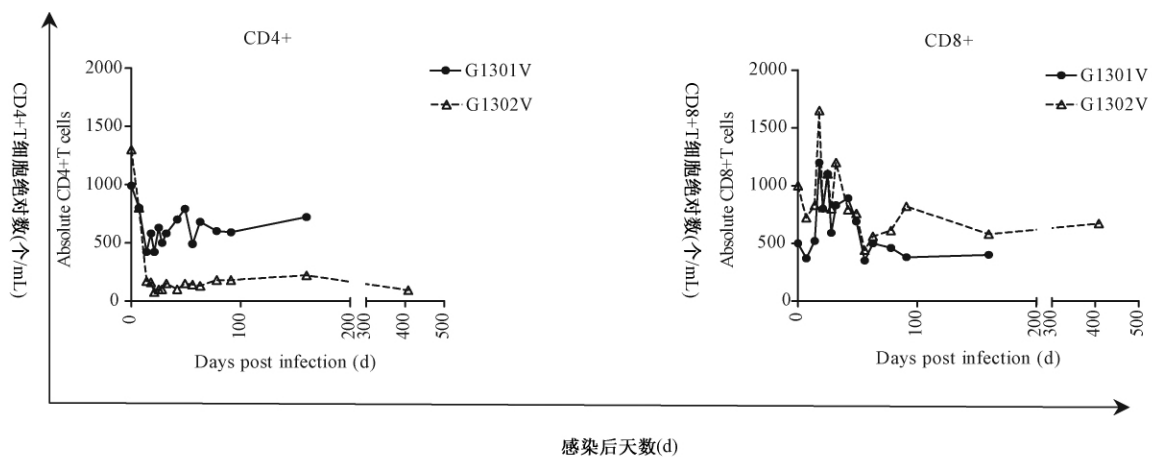


图3 SHIVKU-1 感染恒河猴外周血 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞绝对数的变化

Fig. 3 CD4⁺ T cell and CD8⁺ T cell counts in peripheral blood of the Chinese-origin rhesus macaques infected with SHIVKU-1 intravenously

中的 CD4⁺ Tem 细胞含量增幅明显,并持续保持在较高水平(图4)。

2.6 SHIVKU-1 感染中国恒河猴外周血抗 SHIVKU-1 IgG 抗体水平变化

感染后4周,外周血中检出抗 SHIVKU-1 IgG 抗

体,G1301V 在2周内血清中抗体滴度就上升到 1:400,随后一直维持不变。G1302V 低抗体水平维持到感染后42 d,随后上升,至75 d 达到了 1:800(图5)。

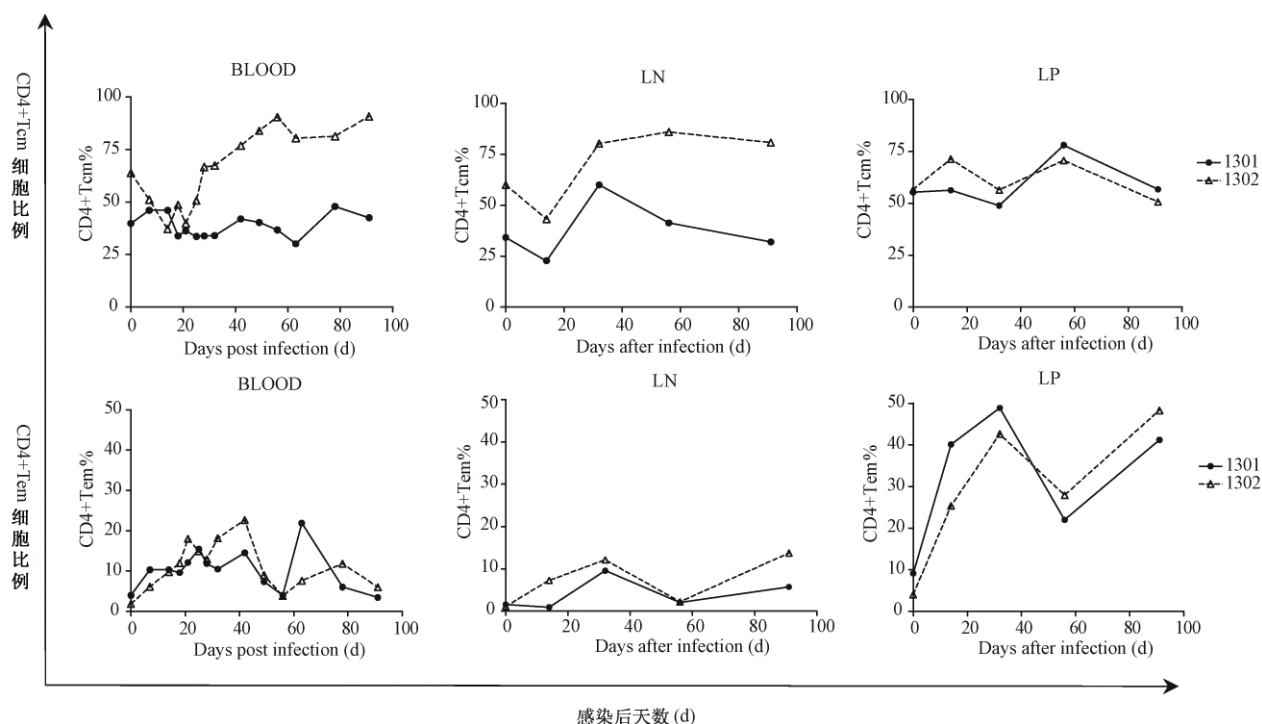
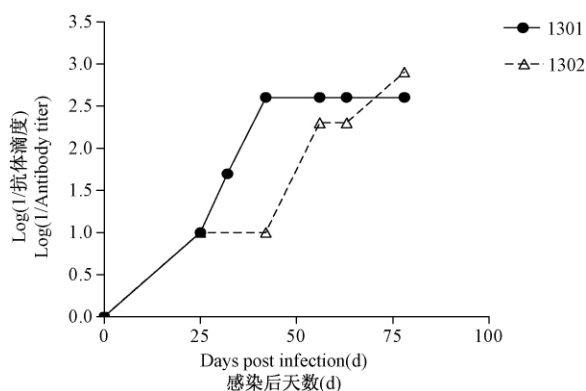
图 4 SHIVKU-1 感染恒河猴外周血 CD4⁺T 淋巴细胞亚群变化Fig. 4 The CD4⁺T cell subsets in the Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIVKU-1

图 5 SHIVKU-1 感染恒河猴外周血抗 SHIVKU-1 IgG 抗体水平变化

Fig. 5 Plasma IgG level in the Chinese-origin rhesus macaques infected intravenously with SHIVKU-1

3 讨论

SHIVKU-1 是 CXCR4 嗜性的 SHIV 毒株,能够感染猪尾猴和恒河猴,急性期引起外周血 CD4⁺T 细胞耗竭,3 个月至 8 个月就能导致感染猴发病甚至死亡^[2,3]。本研究从 NIH NIAID 引进了该株 SHIVKU-1 病毒,静脉途径感染了两只中国恒河猴。与文献报道相同,该病毒在短期内就引起了感染猴外周血 CD4⁺T 细胞的急剧下降,尤其是 G1302V,降幅高达 86%,虽然中期逐渐恢复,也只恢复到初

始水平的 40%。感染前期 CD4⁺/CD8⁺ 最低降到 0.1,外周血 CD4⁺T 绝对数下降到 76 个/ml。3 个月后 CD4⁺/CD8⁺ 恢复到 0.2,绝对数升至 180 个/mL,但仍然在 200 个/mL 以下。可见病毒感染对 CD4⁺T 细胞的损伤很重。这种 CD4⁺T 细胞的损伤同样发生在腹股沟淋巴结和十二指肠粘膜固有层中,下降的趋势与外周血基本相同。相比较而言,外周淋巴结内变化的幅度与外周血更为接近,而固有层中的表现相对温和。

CD4⁺T 细胞中的记忆细胞亚群在病毒感染过程中起着重要的作用,T_{cm} 发挥效应性记忆功能,能稳定地增殖并在抗原刺激下分化为效应细胞,T_{em} 介导保护性记忆,常迁移到外周炎症部位发挥效应功能。本研究中,在感染初期,作为病毒攻击的靶细胞,CD4⁺T_{cm} 细胞比例有一个下降,随后上升,同时 CD4⁺T_{em} 的比例也大幅度增加,提示感染后机体的免疫系统被激活,细胞活化增殖,发挥免疫调控作用。这种免疫激活在不同组织中均有反应。在外周血和淋巴结中 CD4⁺T_{em} 的比例增加明显,提示淋巴结作为外周淋巴器官,是引起 T_{cm} 细胞活化的主要场所。而 CD4⁺T_{em} 在肠道固有层中增幅最显著,其次为外周血,其数量的增加可能和外周循环中活化的淋巴细胞大量归巢相关,粘膜固有层在 CXCR4 嗜性的病毒感染中同样 (下转第 66 页)

- [3] Cunha GR. Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate [J]. Cancer, 1994; 74: 1030-1044.
- [4] Hamilton W, Boyd J, Mossman H. Human Embryology. Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1959.
- [5] Chang C, Saltzman A, Yeh S, et al. Androgen receptor: An overview. [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1995, 5(2): 97-125.
- [6] Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer [J]. Endocr Rev, 2004; 25(2): 276-308.
- [7] Thomson AA. Mesenchymal mechanisms in prostate organogenesis [J]. Differentiation, 2008, 76(6): 587-598.
- [8] Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses [J]. Arch Histol Cytol, 2004, 67(5): 417-434.
- [9] Yu SQ, Yeh CR, Niu YJ, et al. Altered prostate epithelial development in mice lacking the androgen receptor in stromal fibroblasts [J]. Prostate, 2012, 72(4): 437-449.
- [10] Wu XT, Wu J, Huang JP, et al. Generation of a prostate epithelial cell-specific Cre transgenic mouse model for tissue-specific gene ablation [J]. Mech Dev, 2001, 101: 61-69.
- [11] Cunha GR, Chung LW. Stromal-epithelial interactions - I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice [J]. Steroid Biochem, 1981, 14(12): 1317-1324.
- [12] Cunha GR, Lung B. The possible influence of temporal factors in androgenic responsiveness of urogenital tissue recombinants from wild-type and androgen-insensitive (Tfm) mice [J]. Exp Zool, 1978, 205(2): 181-193.

(修回日期)2013-04-25

(上接第 57 页)

是主要的免疫效应部位。

感染后,两只实验猴都在早期就出现了病毒血症,虽然病毒载量水平并不是很高,只有 1×10^4 copies/mL 左右,但持续时间很长,到感染后 3 个月,血浆病毒载量一直呈阳性。两只感染猴健康状况良好,没有急性期发病的迹象。由于 Dr. Sanjay Joag 使用的是猪尾猴和印度恒河猴,并且没有测定血浆病毒载量,因此无法判断感染猴的血浆病毒水平是否相当。Joag 提到感染猴中存在四种感染模式^[9],其中亚急性和慢性感染两种情况可能与我们的实验情况相仿,感染猴保持健康带毒状态,并没有在短期内急性发病致死。G1302V 在感染 1 年左右才开始出现临床症状,15 个月时死亡,较报道的猪尾猴和印度恒河猴感染后 3 到 8 个月死亡的时间显然是明显地延迟了,这可能与中国恒河猴的遗传背景有一定关系。通常情况下猪尾猴和印度恒河猴对 SIV/SHIV 感染比中国恒河猴反应敏感且强烈一些^[9]。由于本研究引入的样本量小,因此不能全面了解 SHIVKU-1 感染中国猴的情况,这将在今后工作中予以补充完善。但就目前情况来看,中国恒河猴感染 SHIVKU-1 后,短期内不引发致死性疾病过程,较长时期保持健康带毒状态,维持中低水平病毒载量,这将是进行药物评价的良好平台。

参考文献:

- [1] Li J, Lord CI, Haseltine W, et al. Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmacX virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins [J]. Acquir Immune Defic Syndr, 1992, 5(7): 639-646.
- [2] Joag SV, Zhuang Li Z, Foresman L, et al. Chimeric simian/human immunodeficiency virus that causes progressive loss of CD4 T cells and AIDS in pig-tailed macaques [J]. J Virol, 1996, 70(5): 3189-3197.
- [3] Joag SV, Li Z, Larry Foresman L, et al. Characterization of the pathogenic KU-SHIV model of acquired immunodeficiency syndrome in macaques [J]. AIDS Res Human Retroviruses, 1997, 13(8): 635-645.
- [4] 熊竞,丛喆,王卫,等. SHIVSF162P3 病毒感染急性期复制水平与慢性期 CD4⁺T 细胞亚群分布及频度相关性分析 [J]. 中国病毒病杂志, 2012, 2(5): 354-359.
- [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 Hum Retroviruses, 2000, 16(13): 1247-1257.
- [6] 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.

(修回日期)2013-04-10