

SHIV-XJ02170 感染恒河猴后期的 传代特点和 *env* 基因变异

陶真¹, 丛喆¹, 刘强¹, 李悦³, 刘浩¹, 王卫¹, 金光¹, 陈霆¹,
姚南¹, 蒋虹¹, 杨贵波², 李喆^{2,3}, 魏强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. 中国疾病预防控制中心性艾中心, 北京 102211;
3. 南开大学艾滋病研究中心, 天津 300071)

【摘要】 目的 研究 SHIV-XJ02170 在中国恒河猴感染后期传代过程中病毒和宿主的变化特点, 并分析 *env* 基因的序列变异。方法 将感染中国恒河猴 G0401V 后期(5年)的 SHIV-XJ02170 病毒垂直传代 2 只猴(G0401V → G0402V → G0403V), 同时, 剔除 G0401V 猴 CD8⁺ T 细胞使潜伏的病毒大量复制后传代 1 只猴(G0401V → G0404V), 应用流式细胞术、病毒载量测定、序列分析等方法研究该病毒在猴体内长期适应后的病毒和免疫学指标及序列变异特点。结果 G0401V 在感染后期仍能稳定传代, 且表现出毒力增强的特点。其传代猴 G0402V 在传代后 41 d 死亡, 外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞衰竭, 仅为 43 个/mL, 符合艾滋病感染猴快速进展型的特征。剔除体内 CD8⁺ T 细胞之后的传代猴 G0404V 的表现类似 G0401V, 即长期低水平的病毒血症水平。*env* 基因序列分析发现 SHIV-XJ02170 在 G0401V 体内长期适应后发生了可遗传的序列变异, 并引起糖基化位点的改变。结论 SHIV-XJ02170 在猴体长期适应后的传代过程中表现出向强毒株过渡的特征, 为进行 SHIV-XJ02170 感染性克隆的构建奠定了良好的实验基础。

【关键词】 SHIV-XJ02170; CD8⁺ T 细胞体内剔除; 传代; *env*; 变异

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)02-0036-08

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.02.09

Characteristics of SHIV-XJ02170 Passaging in Chinese-Origin Rhesus Macaques in Late Infection Stage and Sequence Variation of *env* Gene

TAO Zhen¹, CONG Zhe¹, LIU Qiang¹, LI Yue², LIU Hao¹, WANG Wei¹, JIN Guang¹, CHEN Ting¹,
YAO Nan¹, JIANG Hong¹, YANG Gui-bo², LI Zhe^{2,3}, WEI Qiang¹

(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. National Center for AIDS/STD Control and Prevention, China CDC, Beijing 102211; 3. Center for AIDS Research, Nankai University, Tianjin 300071)

【Abstract】 Objective To explore the characteristic changes of SHIV-XJ02170 during serial passages in Chinese rhesus macaques in late infection stage and to identify the sequence variation of *env* gene. **Methods** Viral bloods from

[基金项目] 国家十一五科技重大专项课题(2009ZX10004-402), 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] 陶真, 女, 硕士研究生, 从事实验动物病毒学研究工作。

[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。

macaque G0401V infected with SHIV-XJ02170 in late infection stage of 5 years were used for passaging 2 monkeys (G0401V→G0402V→G0403V) without CD8⁺T deletion and 1 monkey (G0401V→G0404V) with CD8⁺T deletion. Flow cytometry, viral load detection and sequence alignment were used to analyze the change features during serial passages.

Results SHIV-XJ02170 incubated in G0401V showed stable infectivity during late infection for 5 years and its virulence was enhanced after passaging in vivo, especially after CD8⁺T cell deletion by injection of CM-T807. G0402V showed a sharp decline of weight and CD4⁺T cell counts in peripheral blood, and died suddenly on day 41 after infection. Monkeys G0403 and G0404 showed a viral load peak on day 14, then maintained low viral load level ($10^4 - 10^5$ copies/mL) up to now after passaging (141 d). Sequence alignment analysis showed significant variation in *env* region and changes of N-glycosites in gp120 region. **Conclusions** The infectivity of SHIV-XJ02170 is significantly enhanced during serial passages in vivo and this study provides a firm basis for SHIV-XJ02170 infectious molecular clone construction.

【Key words】 SHIV-XJ02170; CD8⁺T cells deletion in vivo; Passage; *env*; Sequence variation; Rhesus macaques

由南开大学吴颖运博士构建的 SHIV-XJ02170, 是以 SHIV-KB9 为骨架, 携带 B'/C 重组亚型 HIV 中国流行株的 *env* 基因^[1]。虽然通过一系列的猴体传代, 并未出现致病性强毒株, 但是传代猴 A0408 体内的病毒在长期适应和传代过程中, 毒力明显增强^[2]。本文是在前期工作基础上, 针对 A0408 体内适应的 SHIV-XJ02170 病毒, 进一步开展猴体传代和 CD8⁺T 细胞剔除研究, 分析其 *env* 基因的变异情况, 以期在分子水平上找到病毒毒力增强的机制, 为下一步构建致病性感染性克隆奠定工作基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及编号

健康中国恒河猴 1 只 (实验编号 G0404V), 购自北京协尔鑫公司 [SCXK (京) 2005-2005]。体重 5 kg。实验前经过相关慢病毒 (SIV、SRV-1、2、5、STLV-1) 间接免疫荧光法 (IFA) 检测为阴性。

实验猴 A0408: 本项目实验编号 G0401V。SHIV-XJ02170 中国恒河猴体内传代二代实验猴。该猴急性期后一直维持低水平的病毒血症。本研究前 3 个月内未检测到病毒载量。

实验猴 A0411: 本项目实验编号 G0402V。SHIV-XJ02170 中国恒河猴体内传代三代实验猴, 初期表现为一过性病毒感染, 但在随后 5 年多的时间内未检测到血浆病毒载量。

实验猴 A0413: 本项目实验编号 G0403V。SHIV-XJ02170 中国恒河猴体内传代三代实验猴, 从未建立起系统性感染过程。

1.2 SHIV-XJ02170 感染猴 G0401V 体内 CD8⁺T 细胞的剔除

SHIV-XJ02170 感染猴 G0401V 在感染后 2 020 d 进行体内 CD8⁺T 淋巴细胞剔除, 2 周内连续

4 次注射 CM-T807 抗体^[3]。将感染后 2 020 d 定为剔除 CD8⁺T 细胞后 0 d。

1.3 SHIV-XJ02170 在中国恒河猴体内的传代

G0401V 感染后 1 950 d, 取 6 mL EDTA 抗凝全血经静脉途径感染 G0402V。G0402V 感染后 41 d, 采集 6 mL EDTA 抗凝全血经静脉途径传代给 G0403V。G0401V 感染后 2 041 d, 即剔除 CD8⁺T 细胞后 21 d, 采集 5 mL EDTA 抗凝全血经静脉途径传代 G0404V (图 1)。

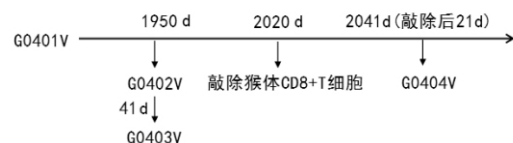


图 1 SHIV-XJ02170 动物传代示意图

Fig. 1 The sketch map of serial passage of SHIV-XJ02170 in rhesus macaques

1.4 SHIV-XJ02170 感染猴 EDTA 抗凝全血的采集

SHIV-XJ02170 猴体传代后定期采集 EDTA 抗凝血, 用于血常规、病毒载量、CD4⁺/CD8⁺比值的测定及序列变异分析。前 4 周内每周采两次, 间隔 3~4 d, 5 周到 12 周每周采集 1 次, 12 周之后每两周采集 1 次, 每次 3 mL。

1.5 SHIV-XJ02170 感染猴外周血 T 细胞亚群分析

CD3-PerCP、CD4-FITC 和 CD8-PE 抗体标记 EDTA 抗凝全血中淋巴细胞, 流式细胞仪测定 CD4⁺/CD8⁺比值。参照血常规结果, 计算出外周血 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的绝对数。

1.6 SHIV-XJ02170 感染猴血浆病毒载量测定

Trizol 法提取血浆中病毒的 RNA, QuantiTect

SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) Roche LightCycler 荧光定量仪测定血浆病毒 RNA 载量^[4]。

1.7 核酸提取及序列变异分析

对 4 只 SHIV-XJ02170 传代猴,选择血浆病毒载量阳性的时间点,扩增外周血淋巴细胞基因组中前病毒 DNA *env* 基因中的长约 2.2 kb 的片段(7346-9555)。外套正向引物 GBK-1003(+):5'-ATGATC TGTAGTGCTACAGAAA-3',反向引物 GBK-1004(-):5'-CAATCAAGAGTAAGTCTCTCAA-3';内套正向引物 GBK-1010(+):5'-AATTGTGGGTCAC AGTCTATTAT-3',反向引物 GBK-1011(-):5'-GTGGTAGCTGAAGAGGCACA-3'^[5]。外套的 PCR 条件为:94℃ 3 min,50℃ 1 min,72℃ 3 min;94℃ 30 s,60℃ 45 s,-1℃/循环,72℃ 3 min,10 循环;94℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 3 min,24 循环;72℃ 10 min。内套的 PCR 条件为:94℃ 3 min,50℃ 1 min,72℃ 3 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 3 min,34 循环;72℃ 7 min。PCR 产物经电泳鉴定无误后,用 QIAquick Gel Extraction Kit 纯化,连接 T 载体,进行序列测定。

序列经 Vector NTI Suite 8 软件编辑校正后,使用 BioEdit Sequence Alignment Editor 软件进行分析。用 MEGA4 软件的 Neighbor Joining 法绘制系统进化树。在美国 Los Alamos 国家实验室 HIV 核酸序列库网站分析糖基化位点 <http://www.hiv.lanl.gov/>。

2 结果

2.1 SHIV-XJ02170 感染动物临床表现

G0401V 在长期感染过程中,身体状况良好,无典型感染症状。但在体内 CD8⁺T 淋巴细胞剔除后 0 d~14 d 期间,食欲不振,精神萎靡,14 d 后逐渐恢复正常。传代猴 G0402V 在传代前健康状态良好,但在感染后精神逐渐萎靡,35 d 后急剧消瘦,并于 41 d 死亡。G0403V 和 G0404V 在传代前、后均未出现明显异常,未出现皮疹、体重下降、食欲不振、机会性感染等典型的艾滋病症状。

2.2 SHIV-XJ02170 感染动物淋巴细胞变化特点

2.2.1 SHIV-XJ02170 感染动物 CD4⁺/CD8⁺ 值及 CD4⁺T 细胞绝对数的变化:G0401V 在剔除猴体 CD8⁺T 细胞之前,CD4⁺/CD8⁺ 值接近 1。注射剔除试剂的 2 周内,未能检测到 CD8⁺T 淋巴细胞,因此也无法测出 CD4⁺/CD8⁺ 值。而 CD4⁺T 细胞急剧减少到 154 个/ μ L(11 d)。剔除后 18 d 测出 CD4⁺/CD8⁺ 值为 6.8,随后逐渐下降,42 d 达到最低值 1.19,此后比值一直在 1 附近波动。CD4⁺T 细胞数目从剔除后 14 d 开始大致呈上升趋势,168 d 达到 800 个/ μ L。

3 只传代动物(G0402V,G0403V,G0404V)在感染 SHIV-XJ02170 之前,CD4⁺/CD8⁺ 值均大于 1,感染之后均发生不同程度的倒置。其中 G0402V 表现最为明显,最低比值接近 0.5,CD4⁺T 细胞数目由 622 个/ μ L(34 d)骤减到 43 个/ μ L(41 d)。G0403V 和 G0404V 都在感染后出现 CD4⁺/CD8⁺ 值的轻微倒置,又很快恢复到 1 以上,此后也一直在 1 附近徘徊。CD4⁺T 细胞数目分别在 800 个/ μ L 和 1100 个/ μ L 水平上下波动,未见明显减少(图 2)。

2.2.2 G0401V 剔除体内 CD8⁺T 细胞后外周血 CD8⁺T 细胞绝对数的变化:注射 CM-T807 抗体前,G0401V 体内的 CD8⁺T 细胞数为 840 个/ μ L。注射后 CD8⁺T 细胞急剧下降,注射后 4 d 为 0 个/ μ L。在 7 d 有一小幅反弹,达到 65 个/ μ L,随后又下降至 0,直到 18 d 才再次上升至 80 个/ μ L。在 28 d~84 d 期间,CD8⁺T 细胞绝对数相对平稳,维持在 200 个/ μ L 的较低水平。84 d 后细胞数缓慢上升,于 168 d 接近剔除前的水平(图 3)。

2.3 SHIV-XJ02170 传代感染猴病毒学反应特点

G0401V 在剔除体内 CD8⁺T 细胞之前病毒载量为阴性,剔除之后,病毒载量迅速反弹。1 周即达到 10^6 copies/mL,随后逐渐下降,在 14 d~21 d 期间下降缓慢,介于 10^4 ~ 10^5 copies/mL 之间,28 d 之后的检测结果均为阴性。

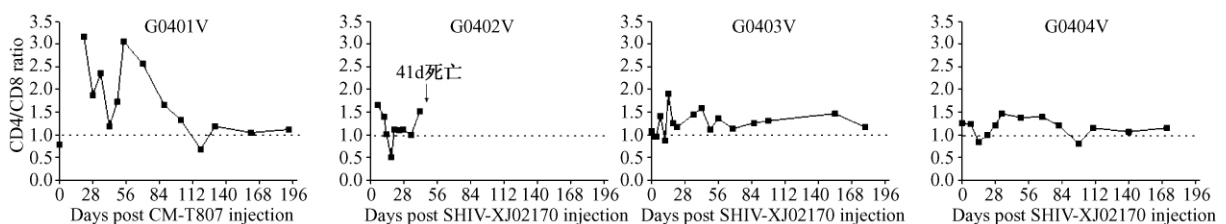


图 2 SHIV-XJ02170 传代感染猴外周血 CD4⁺/CD8⁺ 值及 CD4⁺T 细胞绝对数的变化

Fig. 2 The changes of CD4⁺/CD8⁺ ratio and CD4⁺T cell counts in the peripheral blood of 4 rhesus monkeys

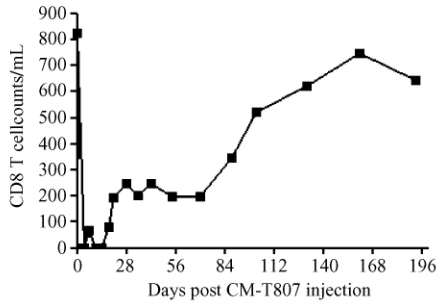


图 3 G0401V 剔除体内 CD8⁺T 细胞后外周血 CD8⁺T 细胞绝对数的变化

Fig. 3 The changes of CD8⁺T cell counts in the peripheral blood of G0401V after CM-T807 injection

G0402V 仅在 10 d 出现一过性的载量高峰,且峰值较低,约为 10⁵copies/mL,17 d 转阴。

G0403V 在 4 d 检测到载量,约为 10⁴copies/mL,并在这一水平维持了近 2 周后消失,56 d 一过性反弹至 10⁴copies/mL,随后再次转阴。

G0404V 感染 SHIV-XJ02170 后病毒载量的变化趋势与 G0401V 剔除体内 CD8⁺T 细胞后的变化趋势相同,在感染后 7 d 出现峰值 10⁶copies/mL。

并且在感染后的潜伏期内多次出现载量反弹,反弹的载量峰值在 10⁴ ~ 10⁵copies/mL 之间(图 4)。

2.4 SHIV-XJ02170 传代猴 PBMCs 中前病毒 DNA *env* 基因的变异分析

2.4.1 SHIV-XJ02170 传代猴 PBMCs 中前病毒 DNA *env* 基因的扩增:4 只 SHIV-XJ02170 传代猴,选择血浆病毒载量阳性的时间点,扩增外周血淋巴细胞基因组中前病毒 DNA *env* 基因中的长约 2.2 kb 的片段(7346 ~ 9555)。其中 11 份样本扩增出了 2 200 bp 的目的条带。依次为:G0401V 剔除后 0、7、14、21 d,G0402V 感染后 10、13 d,G0403V 感染后 56 d 和 G0404V 感染后 7、28、67、110 d(图 5)。

2.4.2 SHIV-XJ02170 传代猴 PBMCs 中前病毒 DNA *env* 基因的系统进化树分析:从系统进化树中可看出,在剔除 G0401V 体内 CD8⁺T 细胞之前的传代线路(G0401V → G0402V → G0403V)中,SHIV-XJ02170 的序列在 G0402V 体内发生了较大的变异,继续传代后在 G0403V 体内发生了回复突变。而在剔除之后 G0401V 的序列可以分为两簇,簇 I 与原始克隆株序列聚集在一起,簇 II 与传代动物 G0404V 的序列聚在一起,且与原始序列的基因距离较大(图 6)。

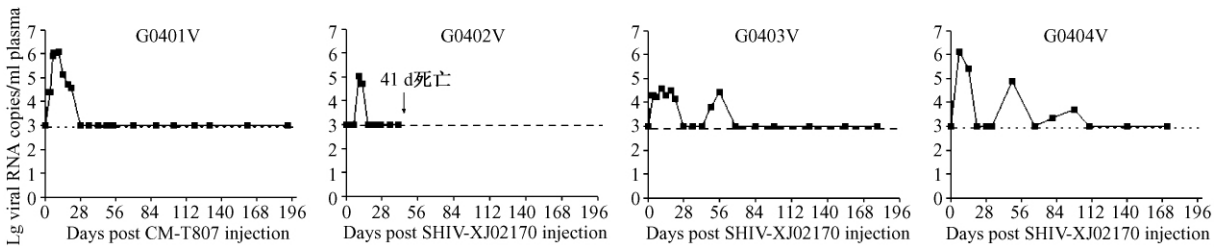
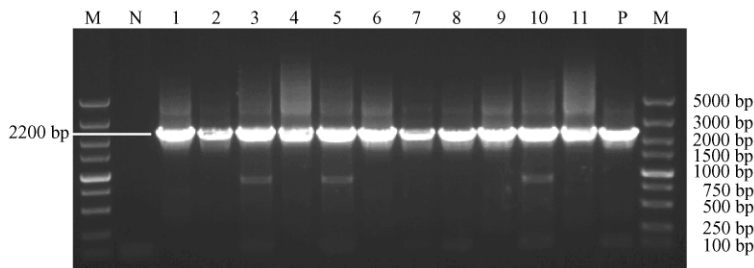


图 4 SHIV-XJ02170 传代感染猴外周血病毒载量的变化

Fig. 4 The changes of viral load in peripheral blood of 4 rhesus monkeys



注:M:DL5000 DNA marker;N:阴性对照;P:阳性对照;1-4:G0401V 剔除后 0 d、7 d、14 d、21 d;5-6:G0402V 感染后 10 d、13 d;7:G0403V 感染后 56 d;8-11:G0404V 感染后 7 d、28 d、67 d、110 d。

Note:M:DL5000 DNA marker;P:Positive control;N:Negative control;1-4:G0401V 0 d,7 d,14 d and 21 d after the CD8⁺T cell deletion;5-6:G0402V,10 d and 13 d post passing;7:G0403V,56 d post passing;8-11:G0404V,7 d,28 d,67 d and 110 d post passing.

图 5 巢式 PCR 扩增 *env* 基因的电泳结果

Fig. 5 Results of nest-PCR amplification with *env* primers

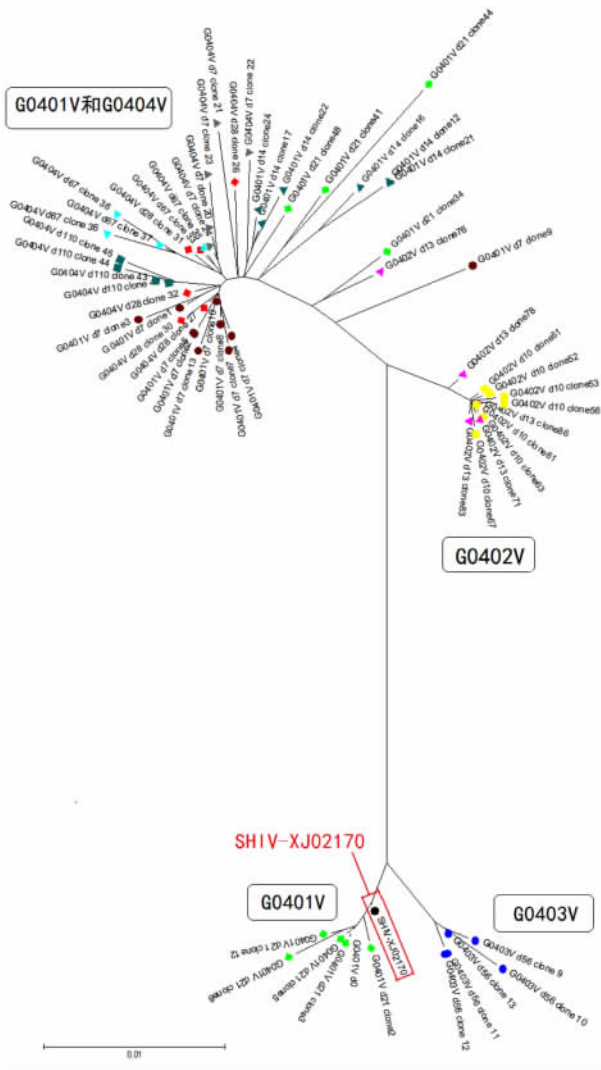


图 6 SHIV-XJ02170 病毒 cDNA Env 基因系统进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree of Env nucleotide sequences during SHIV-XJ02170 passaging

2.4.3 SHIV-XJ02170 传代猴 Env 区的氨基酸序列的变化及糖基化位点预测:根据系统进化树中基因分簇的结果,在来源于同一样品的所有克隆中,挑选出代表主要变异趋势的序列,进行氨基酸序列的比对及糖基化位点预测。其中 G0401V 21 d 选择了两条序列,其余样品各选择一条序列。

序列比对结果显示,env 基因的变异主要发生在 gp120 区,并且集中在 V1、V2、C3、V4、C4 和 V5 区。糖基化位点的改变也主要位于这些区。其中 V1 和 V2 区的糖基化位点的位置发生了改变,C3、V4、C4 和 V5 区增加了新的糖基化位点。而 C1、C2、V3 和 C5 区序列最为保守,糖基化位点没有变化。

G0401V 0d、G0401V 21 d-1 与 G0403V 56 d 的

氨基酸序列与 SHIV-XJ02170 的祖序列较为接近,变异较少。只发现 G0403V 56 d 在 gp120 区 336 位点新增了一个糖基化位点,糖基化位点的位置均没有变化。G0402V 10 d 和 13 d 的样品变化一致 gp120 区 139 和 191 位点处原糖基化位点的位置改变,并在 336、410 和 450 位点增加了新的糖基化位点。G0401V 7、14、21 d-2 以及 G0404V 的所有样品(7、28、67 d 和 110 d)的变化基本相同,除包含 G0402V 样品所有的变化之外,还在 461 位点增加了新的糖基化位点。此外还发现 G0404V 110 d 序列在 143 位点由于碱基突变造成了糖基化位点的缺失。(图 7 和表 1)

表 1 SHIV-XJ02170 病毒 gp120 区糖基化位点的变化
Tab. 1 Statistics of N-glycosites in SHIV-XJ02170 gp120 region

样品 Samples	糖基化位点总数 The number of N-glycosites	新增的个数 Increased number	缺失的个数 Deleted number
SHIV-XJ02170	22	—	—
G0401V 0 d	22	0	0
G0401V 7 d	26	4	0
G0401V 14 d	26	4	0
G0401V 21 d-1	22	0	0
G0401V 21 d-2	25	4	1
G0402V 10 d	25	3	0
G0402V 13 d	25	3	0
G0403V 56 d	23	1	0
G0404V 7 d	27	5	0
G0404V 28 d	26	4	0
G0404V 67 d	26	4	0
G0404V 110 d	25	4	1

相对于 gp120 区的较大变异, gp41 区基因序列的有义突变很少,只在部分样品中发现氨基酸的转换,未见大片段丢失。其中 G0401V 0 d、G0401V 21 d-1 和 G0403V 56 d 的氨基酸序列与 SHIV-XJ02170 的原始序列完全一致。其他样品均有 5 个氨基酸位点的改变,分别为 gp41 区的 38 位点(R→K)、93 位点(V→A)、114 位点(R→K)、121 位点(D→G)和 196 位点(L→I)。

2.4.4 SHIV-XJ02170 传代猴 PBMCs 中前病毒 DNA V3 环顶端四肽分析:env 基因 V3 环顶端为最重要的中和抗体决定簇,由特征性甘-脯-甘-精(GPGR)四肽组成,不同基因亚型毒株四肽存在不同的变异型。SHIV-XJ02170 克隆株的 V3 环顶端四肽为 GPGQ。本研究发现 G0401V 动物及其传代猴的所有样品的 V3 区顶端四肽基序全部为 GPGQ (100%),病毒传代过程中均没有发生改变。

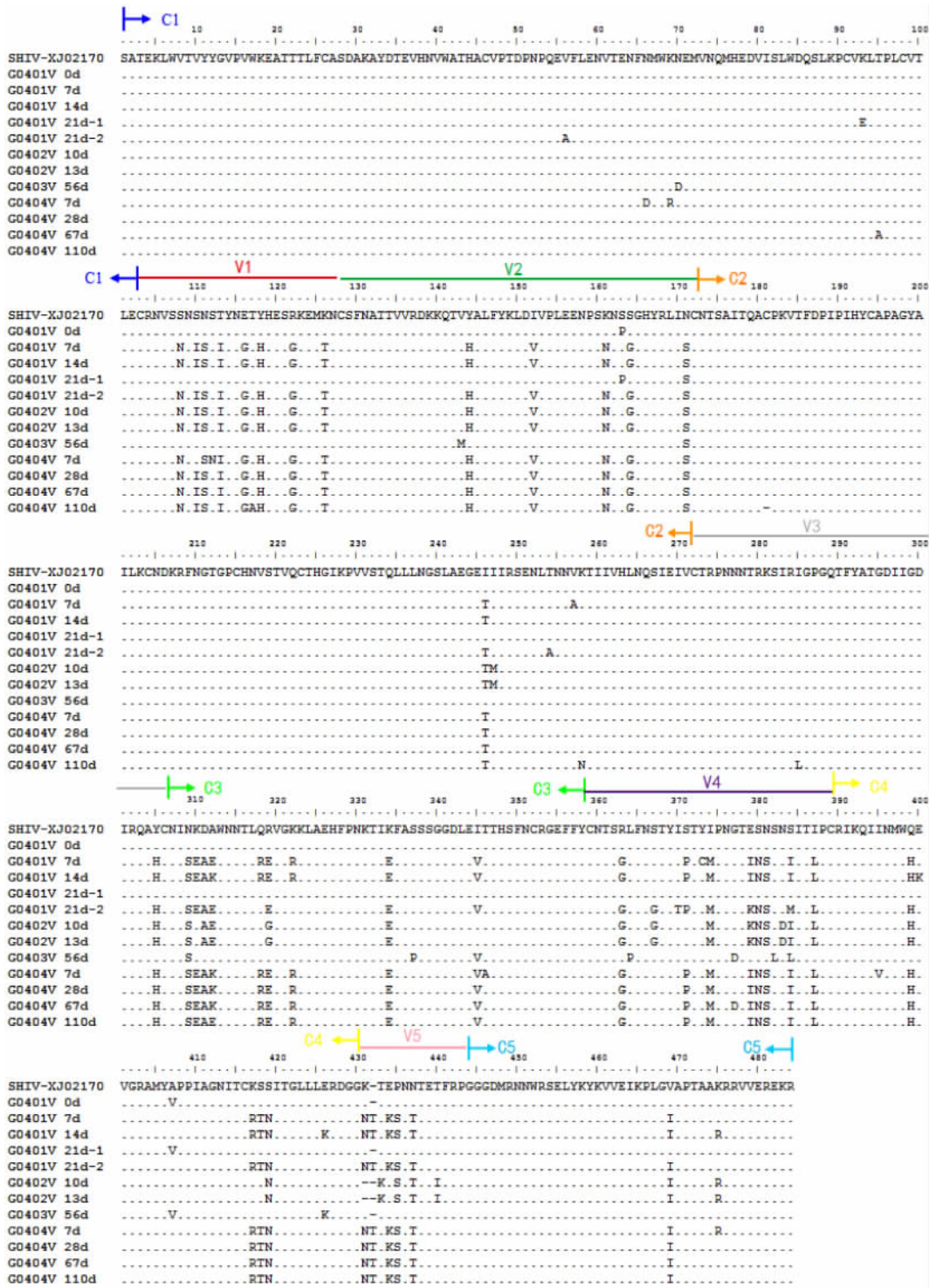


图 7 SHIV-XJ02170 病毒 cDNA env 区 (gp120) 氨基酸序列比对

Fig. 7 Amino acid alignment of env region (gp120) of SHIV-XJ02170 cDNA

2.4.5 SHIV-XJ02170 辅助受体的预测:通过对 V3 环关键氨基酸的分析可预测 SHIV 辅助受体的可能使用情况。V3 环中的 S/GXXXGPGXXXXXXXXXE/D 为预测辅助受体 CCR5 的共同基序。测序结果表明 4 只感染动物的所有克隆 V3 环序列均为 SXXXGPG

XXXXXXXXD(100%) ,即均利用 CCR5 为辅助受体 , 传代过程中病毒的细胞嗜性并未发生改变。

3 讨论

在 SHIV 的研究进展中 ,目前构建最为成功的 ,

应用也最为广泛的是利用欧美流行的 B 亚型 HIV-1 基因构建的 SHIV。而代表中国主要流行趋势 B' / C 重组亚型的 SHIV, 如 SHIV-XJ02170、SHIV-CN97001 和 SHIV-XJDC6431 等, 均不是致病性的强毒株, 不能很好地用于评价针对中国 HIV 流行株设计的疫苗^[6]。

SHIV-XJ02170 是以 B 亚型强毒株 SHIV-KB9 基因为框架重组入中国 CRF07_BC 亚型 HIV-1 主要流行株 *env* 基因构建而成, 在猴体间的传代和猴体内长期适应的过程中, 逐渐表现出由弱向强过渡的特征。为了获得该毒株, 我们在 SHIV-XJ02170 感染猴 G0401V 感染后期进行了病毒分离和传代等研究。因为有文献报道, SHIV-1157ipd 就是在猴感染后期分离出的毒株, 相对于感染早期分离出的 SHIV1157ip 毒力明显增强^[7]。研究证明 G0401V 在感染后期传代的动物 G0402V, 虽然仅出现一过性的病毒载量, 但是感染后 CD4⁺/CD8⁺ 值一度降至 0.5, 34 d 后表现出典型的艾滋病症状, 精神萎靡、急剧消瘦, 41 d 死亡时 CD4⁺T 细胞绝对数只有 43 个/ μ L。这一系列的变化均为艾滋病快速进展型的特征^[8], 表现出 SHIV 强毒株的特点。虽然仅出现一过性病毒载量, 但鉴于 G0402V 在 6 年前感染过 SHIV-XJ02170^[2], 有可能是再次感染相同病毒时发生了同源性保护而导致病毒复制水平的降低。系统进化树分析也显示 SHIV-XJ02170 在传给 G0402V 后变异很大, 相比其他传代动物和原始序列自称一体。为了得到这个可能变强的毒株, 我们在 G0402V 死亡当天进行了再次传代, 但传代猴 G0403V 没有表现出 G0402V 的特征, 仅为一过性感染, CD4⁺/CD8⁺ 值和 CD4⁺T 绝对数等指标也没有特殊的变化, *env* 基因序列分析发现病毒发生了回复突变, 接近 SHIV-XJ02170 祖序列。但是, SHIV-XJ02170 在 G0401V → G0402V → G0403V 的两次传代均是在检测不到病毒载量的情况下进行的, 说明病毒经过 G0401V 体内长期适应后, 已具有稳定传代的能力。针对 G0402V 体内毒株所表现出来的较强致病性, 我们将在下一步构建出感染性克隆, 对病毒毒力的改变做进一步研究。

先期研究发现, 注射 cM-T807 抗体可以剔除中国恒河猴体内 CD8⁺T 淋巴细胞^[3], 对无症状期 SIV/SHIV 感染猴剔除体内 CD8⁺T 细胞, 可以减弱机体免疫系统对病毒的压力, 使体内潜伏的病毒得以大量复制^[9]。为此, 我们对 G0401V 进行体内剔

除 CD8⁺T 细胞实验, 并在载量水平较高时传代。传代动物 G0404V 的病毒复制水平达到 10⁶ copies/mL, 并且可以维持较长时间的病毒载量, 表明 G0401V 体内变强的毒株已经传代给 G0404V。*env* 基因序列分析也发现, G0404V 与 G0401V 剔除后的序列相似度很高。这为我们由克隆株获得致病性的强毒株提供了新思路, 即可以通过剔除体内 CD8⁺T 细胞, 被动释放免疫压力, 诱使体内的病毒发生变异和进行大量的复制, 从而可能出现毒力增强的毒株。

在 G0401V 感染后期的传代及剔除体内 CD8⁺T 细胞的过程中, SHIV-XJ02170 病毒基因既发生了连续进化, 又有回复突变。剔除 CD8⁺T 细胞之前的传代线路中, 病毒的基因距离分别在 G0402V 及其传代动物 G0403V 中表现出先增加后减少的特点。剔除后, G0401V 体内的病毒呈现两种截然相反的变异方向, 其中 21 d-1 接近 SHIV-XJ02170 祖序列, 而 21 d-2 的序列变异远离祖序列。从病毒载量结果上得知, G0401V 在剔除后 14 d ~ 21 d 期间病毒载量下降缓慢, 这是由于猴体内的病毒在与机体的免疫系统的抗争中, 不断通过变异来逃脱机体的免疫压力, 因此造成猴体内同时存在不同的病毒准种。在不同的时间点, 只有某一种或几种基因型序列的病毒占优势。而 G0404V 的传代恰巧是在这个时期进行, 并且延续了后一种变异。序列分析发现, G0404V 所有时间点的样品均与 G0401V 7、14 和 21 d-2 的氨基酸序列匹配率高达 97% 以上, 糖基化位点的变化相同, 在系统进化树上也聚集成一簇。

有文献报道, 膜蛋白的 N 端糖基化位点与病毒的免疫逃逸和 gp120 抗体的中和活性有关, 其数量和定位同样影响病毒与 CD4 受体的结合, 从而影响病毒的复制水平。本研究中发现, 表现出 SHIV 强毒株感染症状的 G0402V, 在 gp120 区新增加了 3 个糖基化位点, 另有 2 个糖基化位点的位置发生改变。而 G0401V 在剔除 CD8⁺T 细胞之后及其传代猴的样品中, 也发现了糖基化位点数目的增加及位置的改变。这些变化有可能增强了病毒与靶细胞 CD4 受体及其他受体的结合能力, 也可能是新的结合位点的暴露, 能阻止中和抗体与 SHIV 包膜蛋白的抗原多肽表位结合, 从而使 SHIV 病毒逃避机体免疫系统的监视^[10]。这从分子水平上部分解释了 SHIV-XJ02170 在 G0401V 及其传代猴体内均表现出毒力增强的特点。

本文的序列变异分析只能部分解释病毒毒力增强的分子机制。至于基因的改变对病毒毒力的影响,比如某个重要氨基酸变化的生物学意义,还需要进一步研究。本研究将继续追踪观察 G0401V 及其传代猴在长期的感染潜伏期中的病毒学、细胞学方面的变化及基因变异趋势,并将采取构建感染性克隆的方式和基因修饰的策略,以获得致病性的 SHIV-XJ02170 强毒株,从而建立相关的动物模型,应用于 HIV 的药物筛选和疫苗评价。

参考文献:

- [1] Wu YY, Hong K, Chenine AL, et al. Molecular cloning and in vitro evaluation of an infectious simian-human immunodeficiency virus containing env of a primary Chinese HIV-1 subtype C isolate [J]. J Med Primatol, 2005, 34(2):101-107.
- [2] 涂新明,丛喆,蒋虹,等. SHIV 病毒在猴体内的复制与传代 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(2):79-83.
- [3] 乔红伟,佟巍,朱华,等. 中国恒河猴 CD8 + T 细胞缺失模型制备 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(6):321-324.
- [4] 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.
- [5] Karlsson GB, Halloran M, Li J, et al. Characterization of molecularly cloned simian-human immunodeficiency viruses causing rapid CD4⁺ lymphocyte depletion in rhesus monkeys [J]. J Virol 1997, 71:4218-4225.
- [6] Meng, Z, Xing H, He X, et al. Genetic characterization of three newly isolated CRF07_BC near full-length genomes in China. AIDS Res Human Retroviruses 2007. 23(8): p. 1049-1054.
- [7] Song RJ, Chenine AL, Shai-Kobiler, et al. Molecularly cloned SHIV-1157ipd3N4: a highly replication competent, mucosal transmissible R5 simian-human immunodeficiency virus encoding HIV clade C Env [J]. J Virol 2006, 80(17):8729-8738.
- [8] 吴小闲,卢耀增,何伏秋,等. 猴免疫缺陷病毒感染猕猴快速进展型死亡特征 [J]. 中国医学科学院院报, 2000, 22(1):71-74.
- [9] Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S. et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes [J]. Science. 1999, 283(5403):857-860.
- [10] Wolk, T, Schreiber M. N-Glycans in the gp120 V1/V2 domain of the HIV-1 strain NL4-3 are indispensable for viral infectivity and resistance against antibody neutralization [J]. Med Microbiol Immunol, 2006, 195(3):165-172.

修回日期)2010-10-09



《中国比较医学杂志》《中国实验动物学报》 入选世界卫生组织西太平洋地区医学索引

世界卫生组织近年来启动了全球卫生图书馆(Global Health Library, GHL)项目。该项目拟建立基于互联网的卫生虚拟图书馆,旨在便捷的向全世界提供卫生相关信息。全球卫生图书馆由非洲区、美洲区、中东区、欧洲区、东南亚区及西太平洋地区共同组成,其中一项主要内容就是建立全球医学索引,提供全世界的医学文献题录及文摘。

世界卫生组织西太平洋地区医学索引(The Western Pacific Region Index Medicus, WPRIM)作为全球卫生图书馆(GHL)的一个重要组成部分,主要收录世界卫生组织西太平洋地区成员国出版的覆盖卫生、生物医学领域的期刊及灰色文献的题录(包括文摘)信息。

中国医学科学院医学信息研究所作为“WPRIM 中国生物医学期刊评审委员会”主任单位,过去两年中已先后组织举办两次评审会议,共评选出 122 种国内优秀的生物医学期刊为 WPRIM 收录期刊。

第三批 WPRIM 期刊评审工作已于 2009 年 10 月正式开展,截止到 10 月 26 日, WPRIM 中国生物医学期刊评审委员会共收到符合 WPRO 期刊评审标准的有效申请 240 份,根据 WPRIM 中国生物医学期刊评审标准,同时兼顾学科领域,经评审委员会评议,共向 WHO 西太区期刊评审委员会推荐 81 种中国生物医学期刊入选 WPRIM,这 81 种中国生物医学期刊中包括《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》!

编辑部向支持两刊出版的读者、作者致以深深谢意!

两刊编辑部
2009-11-10