

SHIV1157ipd3N4 中国恒河猴细胞适应株静脉感染 中国恒河猴有效浓度的确定

丛喆¹, 蒋虹¹, 金光¹, 陈霆¹, 王卫¹, 陶真¹, 姚南¹,
熊竞¹, 吴芳新¹, 陈志伟², 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. 香港大学李嘉诚医学院艾滋病研究所, 香港 999077)

【摘要】 目的 确定 SHIV1157ipd3N4 静脉途径感染中国恒河猴的有效病毒浓度, 明确 SHIV1157ipd3N4 感染实验猴体内病毒复制和免疫损伤情况。方法 10 只正常中国恒河猴分成 6 组, 分别用 10 倍系列稀释的病毒液 1 mL 静脉感染, 测定血浆病毒载量, CD4⁺/CD8⁺, CD4⁺T 淋巴细胞绝对数, 分析感染后恒河猴体内病毒复制和免疫损伤情况。结果 5TCID₅₀/mL 以上浓度的 SHIV1157ipd3N4 能通过静脉途径感染中国恒河猴。结论 该实验的成功进行为 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】 SHIV1157ipd3N4; 中国恒河猴; 模型; 动物; AIDS

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)04-0012-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.04.003

Titration of a SHIV1157ipd3N4 Stock by Intravenous Inoculation of Chinese-Origin Rhesus Macaques

CONG Zhe¹, JIANG Hong¹, JIN Guang¹, CHEN Ting¹, WANG Wei¹, TAO Zhen¹, YAO Nan¹, XIONG Jing¹,
WU Fang-xin¹, CHEN Zhi-wei², WEI Qiang¹

(1. 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 Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China; 2. AIDS Institute, Li Ka Shing Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China)

【Abstract】 Objective To determine the viral concentration of SHIV1157ipd3N4 to infect Chinese-origin *rhesus macaques* intravenously, and to clarify the viral replication and immunological impairment in the monkeys after SHIV1157ipd3N4 inoculation. **Methods** 10 Chinese-origin rhesus macaques were used in this study. Firstly, all the monkeys were screened by serological test to ensure that they were free of SIV, SRV, and STLV. Then they were infected with 1 mL of 10-fold serial dilution of SHIV1157ipd3N4 separately. Finally to make blood routine examination and measure the viral loads of the monkeys by real-time RT-PCR. **Results** More than 5 TCID₅₀/mL of SHIV1157ipd3N4 can infect the Chinese-origin *rhesus macaques* i. v. successfully. **Conclusions** Our findings of this study provide a firm basis for establishing a SHIV1157ipd3N4 infection model of Chinese *rhesus macaques* intravenously. This model would be very useful

[基金项目] 国家十一五科技重大专项课题 (2009ZX10004-402, 2008ZX10001-015-40)。

[作者简介] 丛喆, 硕士, 副主任技师, 从事实验动物病毒分子生物学和模型研究工作。

[通讯作者] 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。

for HIV-1 subtype C vaccine and pathogenesis studies.

【Key words】 SHIV1157ipd3N4; Chinese-origin *rhesus macaques*; Animal model; AIDS

R. M. Ruprecht 以 SHIV_{KB9} 为骨架构建了表达 HIV-1 C 亚型 env 的 SHIV-1157i, 并经静脉途径感染印度恒河猴得到 SHIV1157ipd3N4^[1,2]。它所具有高度复制能力的、CCR5 受体嗜性、经黏膜传播这些特性, 使它在研究 HIV 感染和发病机制及评价 AIDS 候选疫苗的 功效方面具有重要的现实意义。SHIV1157ipd3N4 能通过静脉途径成功感染印度恒河猴, 黏膜途径感染印度恒河猴、猪尾猴和中国恒河猴^[3-4], 但其静脉感染中国恒河猴的有效浓度、疾病进程及所引发的病毒免疫指标有哪些变化, 与黏膜途径感染引起的变化又是否相同呢? 本研究旨在明确 SHIV1157ipd3N4 在中国恒河猴体内感染的有效浓度及在病毒学和免疫学等方面的变化, 为今后此模型在我国的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

中国恒河猴 10 只 购自北京协尔鑫生物资源研究所 [SCXK(京)2005-2005], 用商品化膨化饲料饲养, 体重 3~5 kg。经间接免疫荧光法 (IFA) 检测排除相关慢病毒 (SIV、SRV-1、2、5、STLV-1) 感染。

1.2 病毒

感染毒株为 SHIV1157ipd3N4, 本实验室扩增制备, 批号为 20090706。中国恒河猴 PBMCs 滴定 TCID₅₀ 滴度为 5×10^2 TCID₅₀/mL。

1.3 分组设计及感染方法

10 只恒河猴随机分为 6 个剂量组, 由 10^{-1} 至 10^{-6} , 分别经后肢静脉感染稀释好的病毒液 1 mL。G1005V、G1006V、G1007V (10^{-1} , 50TCID₅₀), G1008V、G1009V、G1010V (10^{-2} , 5TCID₅₀), G1011V、G1012V、G1013V (10^{-3} , 0.5TCID₅₀),

G1014V (10^{-4} , 0.05TCID₅₀)。

1.4 样品采集和指标测定

在感染前和感染后 7、14、21、28、42、56、70 及 84 d 采集 EDTA 抗凝血 4 mL, 分别测定血常规、血浆病毒载量、CD4⁺/CD8⁺、CD4⁺ 细胞绝对数和血浆结合抗体水平。

1.5 SHIV1157ipd3N4 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, Quantitect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, 204243) 测定血浆病毒 RNA 载量^[5]。

1.6 SHIV1157ipd3N4 感染恒河猴 CD4⁺T 细胞绝对数检测

测定外周血中 CD4⁺/CD8⁺ 比值, 根据血常规结果, 计算出 CD4⁺T 细胞绝对数^[6]。

1.7 SHIV1157ipd3N4 感染恒河猴外周血总结合抗体滴度检测

恒河猴血浆样品灭活后系列稀释, 用“人类免疫缺陷病毒抗体诊断试剂盒 (酶联免疫法)” (生物梅里埃, A4 4284018-86) 检测交叉性体液免疫反应, 高于 Cut-off 值的最大血浆稀释度定义为 SHIV 特异性总结合抗体滴度^[7]。

2 结果

2.1 SHIV1157ipd3N4 静脉感染恒河猴外周血病毒载量结果

50 TCID₅₀ 感染猴中 G1005V 和 G1007V 均在感染后 7 d 就检出血浆病毒载量, G1006V 也在 14 d 阳转。5 TCID₅₀ 感染猴 G1008V、G1009V、G1010V 的血浆病毒载量则均出现在感染后 14 d。

6 只感染猴高峰期的载量都在 $10^5 \sim 10^7$ copies/

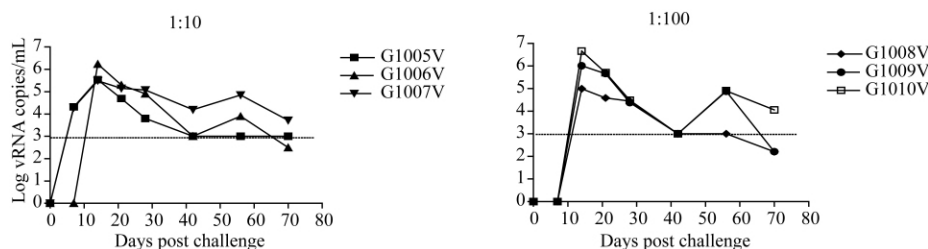


图 1 10 倍系列稀释 SHIV1157ipd3N4 静脉感染中国恒河猴外周血病毒载量结果

Fig. 1 The viremia (viral RNA copies/mL plasma) in the Chinese-origin *rhesus macaques* infected intravenously with 10-fold dilution of SHIV1157ipd3N4

mL 之间, 2 d 后载量水平均有所下降, 但随后反弹。0.5 TCID₅₀ 和 0.05 TCID₅₀ 感染猴 G1011V、G1012V、G1013V、G1014V 在实验期间未出现血浆病毒载量。

2.2 SHIV1157ipd3N4 静脉感染恒河猴 CD4⁺ / CD8⁺ 比值结果

50 TCID₅₀ 感染猴 G1005V、G1006V、G1007V 在感染后 21 d 均有下降, 随后反弹。5 TCID₅₀ 感染猴中除 G1010V 外, G1008V 和 G1010V 也在 21 d 下降并反弹。G1009V 则不降反升, 但它在 56 d 有一次大幅下降, 但也仍然在 1 以上。0.5TCID₅₀ 和 0.05TCID₅₀ 感染猴 G1011V、G1012V、G1013V、G1014V 在实验期间基本保持恒定(图 2)。

2.3 SHIV1157ipd3N4 静脉感染恒河猴 CD4⁺ 细胞绝对数结果

各剂量组之间在 CD4 + T 细胞绝对数上变化基本相同。感染猴中除了 50 TCID₅₀ 感染猴 G1007V 和 5 TCID₅₀ 感染猴 G1008V 在实验后期有升高外, 其它 4 只在整个实验期间基本保持水平。未感染的 4 只实验猴则整体呈现逐渐上升的趋势(图 3)。

2.4 SHIV1157ipd3N4 静脉感染恒河猴外周血总结合抗体滴度测定

50 TCID₅₀ 感染猴 G1005V 和 G1007V 的抗体在感染后 21 d 就出现了, 另一只感染猴 G1006V 也在 28 d 阳转。与此同时, 5 TCID₅₀ 感染猴中只有 G1009V 在 21 d 抗体阳性, 其它两只感染猴 G1008V 和 G1010V 抗体阳转时间为 42 d。42 d 以后, 6 只感染猴之间的抗体水平逐渐接近了。0.5 TCID₅₀ 和 0.05 TCID₅₀ 感染猴 G1011V、G1012V、G1013V、G1014V 在实验期间未检出抗体(图 4)。

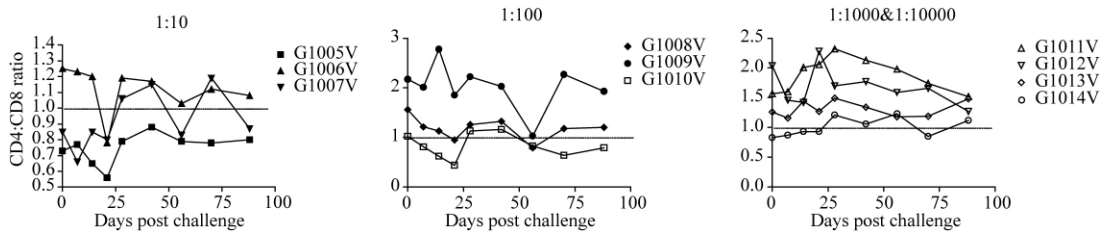


图 2 10 倍系列稀释 SHIV1157ipd3N4 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺ / CD8⁺ T 淋巴细胞比值

Fig. 2 The changes of CD4⁺ / CD8⁺ ratio of T lymphocytes in the Chinese-origin *rhesus macaques* infected intravenously with 10-fold dilution of SHIV1157ipd3N4

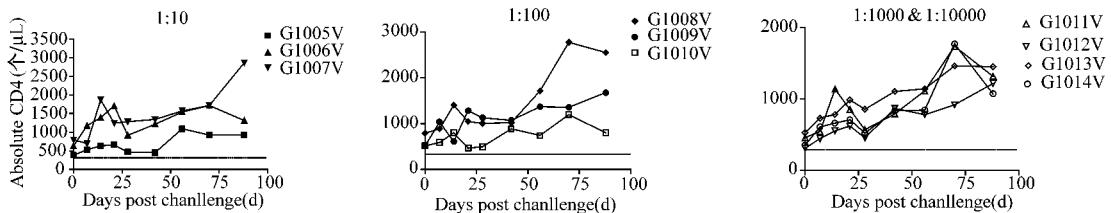


图 3 10 倍系列稀释 SHIV1157ipd3N4 静脉感染中国恒河猴外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞绝对数

Fig. 3 The CD4⁺ T cell counts (per 1 blood) in the Chinese-origin *rhesus macaques* infected intravenously with 10-fold dilution of SHIV1157ipd3N4

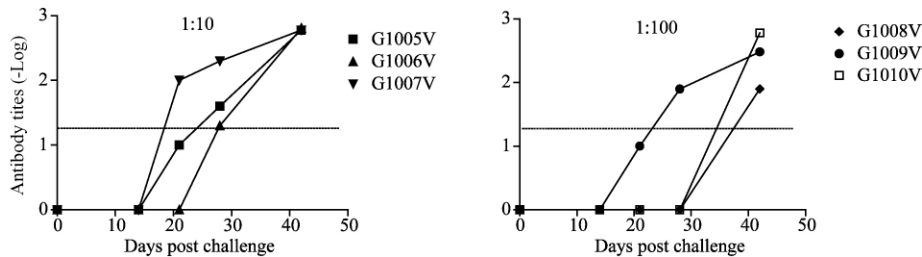


图 4 10 倍系列稀释 SHIV1157ipd3N4 静脉感染中国恒河猴外周血总结合抗体滴度

Fig. 4 The titers of Ab in the Chinese-origin *rhesus macaques* infected intravenously with 10-fold dilution of SHIV1157ipd3N4

3 讨论

SHIV1157ipd3N4。具有高度复制能力、CCR5 受体嗜性和经黏膜传播的特性,使它在研究 HIV 感染和发病机制及评价 AIDS 候选疫苗的功效方面具有重要的现实意义。

本实验室利用中国恒河猴 PBMCs 制备了一批 SHIV1157ipd3N4 的细胞适应株,本研究旨在明确该批次 SHIV1157ipd3N4 细胞适应株静脉途径感染中国恒河猴的有效浓度及在病毒学和免疫学等方面的变化,为今后此模型在我国的应用奠定基础。

本次研究中,我们使用中国恒河猴 PBMCs 对病毒的毒力进行了滴定。根据滴定的结果,使用 4 个 10 倍系列稀释的病毒剂量感染中国恒河猴,通过其血浆病毒载量、 $CD4^+ / CD8^+$ 比值及 $CD4^+$ 细胞绝对数的测定,来确定该病毒感染中国恒河猴的感染剂量范围及感染情况。由于动物数量有限,为了明确剂量效应关系,我们采取了 10 倍系列稀释病毒的策略,拉大了各组之间的病毒剂量范围。并且对可能感染的实验组,各使用了 3 只实验猴,理论上不能被感染的 10^{-4} 稀释度,只用了一只实验猴。结果证明,我们这样安排是可行的。 10^{-1} 到 10^{-2} 的感染猴,即 50 TCID₅₀ 到 5 TCID₅₀ SHIV1157ipd3N4 感染的实验猴均成功建立了系统性感染,而 10^{-3} 和 10^{-4} 的感染猴则没有被感染。根据病毒滴定的结果,1 mL 10^{-3} 和 10^{-4} 稀释度的病毒液中只含有 0.5 TCID₅₀ 和 0.05 TCID₅₀ 的病毒,理论上不可能感染动物,因此目前这个结果和病毒滴定的结果是相符合的,从另一个侧面也证明了病毒滴定的准确性。

与 SHIV_{SF162p3} 静脉感染猴结果略有不同,各不同剂量组阳性猴的病毒、免疫等各项指标没有显示出很明显的量效关系,除高剂量组 (50 TCID₅₀) 的血浆病毒载量出现得比低剂量组 (5 TCID₅₀) 略早几天外,载量的峰值及持续时间都没有依照病毒浓度的高低,有相应的变化。各组感染猴高峰期的载量都在 $10^5 \sim 10^7$ copies/mL 之间, $CD4^+ / CD8^+$ 的变化也基本相同。与未感染猴不同的是,绝大多数感染猴在感染高峰期还是有一个 $CD4^+ / CD8^+$ 的下降,虽然过程很短暂,与此同时,各组之间外周血 $CD4^+ T$ 细胞的绝对数的变化趋势相同,均没有明显的下降。这点也符合之前的报道,对于 CCR5-SHIV 来说, $CD4^+ T$ 细胞的减少主要发生在外周免疫器官,如肠道的派氏淋巴结等,而在外周血中这种变化不明显。

本研究中,我们还注意了静脉感染早期外周血中总结合抗体滴度的变化和攻毒剂量之间的关系。

结果表明,高剂量组 (50 TCID₅₀) 的抗体出现得比低剂量组 (5 TCID₅₀) 略早几天,且抗体水平增长得要快一些,但到了感染后期这种差距就消失了,基本都稳定在一个水平上了。这也说明,在感染早期,机体体液免疫的水平和消长与攻击病毒的剂量有一定的关系,一旦建立了系统性感染,这种区别就不存在了。

SHIV1157ipd3N4 能通过静脉途径成功感染印度恒河猴,黏膜途径感染印度恒河猴、猪尾猴和中国恒河猴,但其静脉感染中国恒河猴的有效浓度、疾病进程及所引发的病毒免疫指标有哪些变化,与黏膜途径感染引起的变化又是否相同呢? 本研究旨在明确 SHIV1157ipd3N4 在中国恒河猴体内感染的有效浓度及在病毒学和免疫学等方面的变化,为今后此模型在我国的应用奠定基础。

总之,通过本次静脉感染中国恒河猴研究,我们成功滴定了本批次 SHIV1157ipd3N4,掌握了 SHIV1157ipd3N4 在恒河猴体内的消长规律,今后可根据具体的实验目的选择合适剂量的 SHIV1157ipd3N4 建立静脉感染模型,进行 AIDS 疫苗评价。

参考文献:

- [1] 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(17): 8729 - 8738.
- [2] Humbert M, Rasmussen RA, Song RJ, 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. Published online 2008 October 17. doi: 10.1186/1742-4690-5-94.
- [3] 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.
- [4] 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, 2010, 201(8): 1155 - 1163.
- [5] 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.
- [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.
- [7] 张月娟,褚国方. ELISA 检测 HIV 抗体室内质控血浆的使用与分析 [J]. 职业与健康, 2007, 23(4): 268 - 269.

修回日期: 2010-10-08