

RT-SHIV 感染中国恒河猴及体内传代

姚南¹, 王卫¹, 丛喆¹, 陈霆¹, 金光¹, 陶真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 了解 RT-SHIV 感染中国恒河猴的感染特点, 研究 RT-SHIV 在中国恒河猴中传代特点; 建立 RT-SHIV 中国恒河猴动物模型, 为评价 HIV-1 药物有效性提供动物平台。方法 选择 4 只健康恒河猴, 其中两只动物经上肢静脉感染 RT-SHIV 病毒, 感染急性期采取外周血分离 CD8⁻ PBMC, 扩增病毒, 将新制备的病毒静脉感染另外两只中国恒河猴, 通过监测血浆病毒载量, CD4⁺/CD8⁺ 比值, CD4⁺ T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的绝对数, 了解实验猴的感染状态, 同时分析病毒 RT 基因变异情况。结果 4 只动物均获得系统性感染, 且传代动物急性期表现更为强烈, RT 基因在感染和传代的过程中共观察到 3 个氨基酸的改变。结论 本研究为 RT-SHIV 中国恒河猴模型的建立提供了基础信息。

【关键词】 RT-SHIV; 传代; RT 基因突变

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)04-0016-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.04.004

RT-SHIV Infected and Passaged in Chinese-Origin Rhesus Monkeys

YAO Nan¹, WANG Wei¹, CONG Zhe¹, CHEN Ting¹, JIN Guang¹, TAO Zhen¹, CHEN Zhi-wei², 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 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 study the characteristics of RT-SHIV passaging in Chinese *rhesus macaques* and to establish a RT-SHIV/rhesus animal model providing an animal platform in evaluation of the effectiveness of HIV-1 drugs.

Methods Four healthy rhesus macaques selected were negative to SIV, SRV and STLV-1. Two monkeys of them were infected with RT-SHIV intravenously. Blood samples were collected from the infected monkeys at the acute phase and CD8⁻ PBMC were isolated, and then propagated RT-SHIV. The propagated RT-SHIV with PBMC were injected intravenously into the other two monkeys. Viral load in plasma, CD4⁺/CD8⁺ ratio and absolute number of CD4⁺ T lymphocytes and B lymphocytes were detected, and the RT gene variation was analyzed. **Results** Systemic infection was established in all of the four *rhesus macaques*, and the two passaged animals demonstrated more severe changes at the acute phase. There were three amino acid changed during infection and passages. **Conclusion** The results of our study provide basic information for the establishment of RT-SHIV/Chinese-origin rhesus monkeys models.

【Key words】 RT-SHIV; Passage; RT gene mutation

[基金项目] “十一五”国家科技重大专项课题 (2009ZX10004-307); 协和青年基金 (RT-SHIV 动物模型的建立)。

[作者简介] 姚南, 男, 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。

从 1981 年以来,艾滋病毒已经发现了近三十年,人类至今仍未研发出有效的艾滋病疫苗,因此抗艾滋病的药物治疗成为重要的防治手段。艾滋病的治疗药物主要为逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂,其针对 HIV-1 的主要基因为 RT 基因和蛋白酶基因。RT-SHIV 病毒为替换进 HIV-1 RT 基因的嵌合病毒^[1],其对以 HIV-1 RT 基因为靶点设计的药物具有很高的敏感性,由其建立的动物模型能够对逆转录酶抑制剂进行药效学评价^[2],同时可研究药物压力下的基因耐药性突变问题。本研究拟通过 RT-SHIV 感染中国恒河猴,并在猴体传代增强 RT-SHIV 感染中国恒河猴的能力,从而为建立一个合格的药效学评价的动物模型提供毒株和实验数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康中国恒河猴 4 只,购自北京协尔鑫公司 [SCXK(京)2005-2005],体重 3 kg 左右。编号分别为 G1101V、G1102V、G1103V、G1104V。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。

1.2 RT-SHIV 毒株

RT-SHIV 由 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Dr. Thomas North and Dr. Joseph Sodroski) 提供^[1,3,4]。

1.3 样品采集

分别于 0、3、7、10、14、21、28、35、42、49、56、66 d 用盐酸氯胺酮对中国恒河猴进行麻醉,采集 EDTA 抗凝血 3 mL。

1.4 RT-SHIV 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) Roche LightCycler 荧光定量仪测定血浆病毒 RNA 载量,该方法灵敏性为 10^3 copies/mL^[5]。

1.5 RT-SHIV 感染恒河猴 CD4⁺T 细胞绝对数和 B 淋巴细胞绝对数检测

根据流式细胞仪测定的 CD4⁺/CD8⁺ 比值,CD20 比值,并根据血常规结果计算出 CD4⁺T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的绝对数。所使用的抗体为 PerCP-CD3 (BD, 552851)、FITC-CD4 (BD, 556615)、PE-CD8 (BD, 557086)、APC-CD20 (BioLegend,

302310),使用 BD FACS Calibur 进行分析。

1.6 RT-SHIV 感染恒河猴全基因组中 RT 基因扩增和测序

用 QIAamp DNA Blood Minikit (Qiagen, 51106) 提取外周血基因组 DNA。巢式 PCR 扩增全基因组中 RT 基因,引物分别为 RT out: CAGAGGATTTGCT-GCACCTCAATTC, Anti-RT out: CAATCCATTTGC-CAAGTCCCTAGAT; RT: ATTAGCCCTATTGAGACTG-TACCA, Anti-RT: AGCACTGACTAATTTATCTACT-TG。外套扩增程序为 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 50℃ 30 s, 68℃ 2 min; 68℃ 10 min, 30 个循环; 内套扩增程序为 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 45℃ 30 s, 68℃ 2 min; 68℃ 10 min, 25 个循环。

2 结果

2.1 RT-SHIV 感染中国恒河猴载量结果

第一代感染恒河猴 G1101V 和 G1102V 分别于 10 d、14 d 检测到病毒载量,最高峰值分别为 6.9×10^5 copies/mL 和 2.1×10^6 copies/mL,于 35 d、42 d 检测不出载量。二次传代恒河猴 G1103V 和 G1104V 在 4 d 便检测到病毒载量,最高峰值分别为 2.5×10^4 copies/mL 和 5.4×10^6 copies/mL, G1103V 于 42 d 检测不出载量, G1104V 在 70 d 仍然在检测灵敏线以上 (图 1)。

2.2 RT-SHIV 感染中国恒河猴细胞绝对数结果

两只第一代感染中国恒河猴表现为, G1101V 的 CD4⁺/CD8⁺ 细胞绝对数比值由 0 d 基本值 1.83 持续波动上升; CD4⁺T 淋巴细胞绝对数在 0 d 基本值 1973 个/ μ L 左右波动,最低值出现在 50 d,为 1598 个/ μ L; B 淋巴细胞绝对数由感染后 3 d 的 5848 个/ μ L 持续下降到 66 d 的 3099 个/ μ L,下降了近 1/2。G1102V 的 CD4⁺/CD8⁺ 细胞绝对数比值在 0 d 基本值 2.07 上下波动, CD4⁺T 淋巴细胞绝对数的 0 d 基本值为 1918 个/ μ L,在第 7 天和 50 d 出现了两个低值分别为 1083 个/ μ L 和 929 个/ μ L; B 淋巴细胞绝对数由感染后 3 d 的 2371 个/ μ L 持续下降至 21 d 的最低值 1286 个/ μ L,继而在 1600 个/ μ L 左右徘徊。

二次传代中国恒河猴表现为, G1103V 的 CD4⁺/CD8⁺ 细胞绝对数比值由 0 d 基本值 1.34 下降到 11 d 的最低值 0.69, 11 d 和 14 d 出现倒置。18 d 恢复到初始水平,后面的时间点在该水平上徘徊; CD4⁺T 淋巴细胞绝对数由 0 d 889 个/ μ L 降到

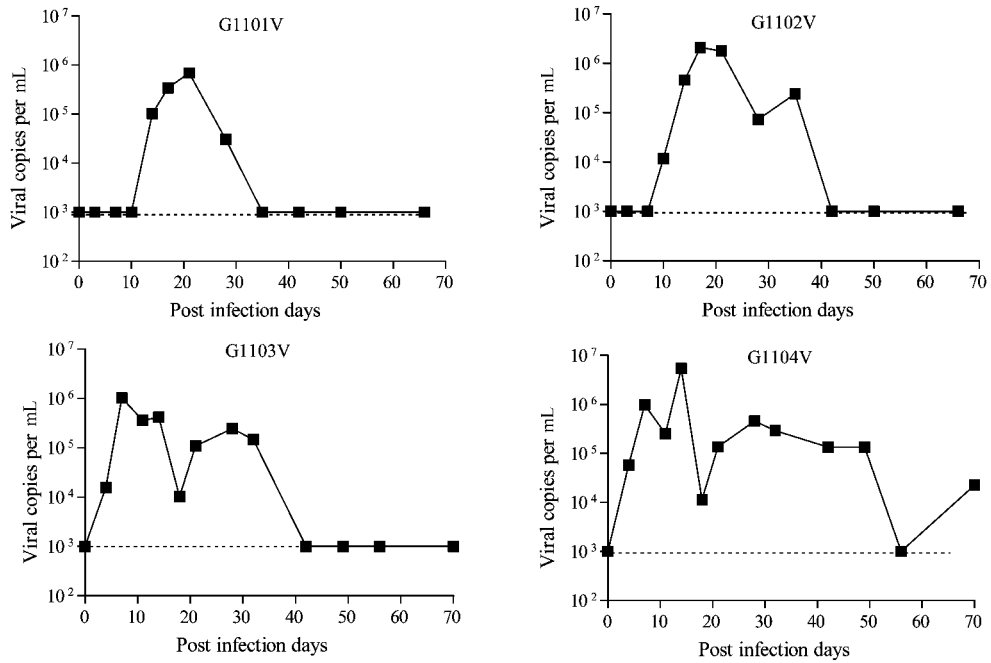


图 1 RT-SHIV 感染恒河猴血浆病毒载量检测图

Fig. 1 Measurement of viral loads following RT-SHIV infection

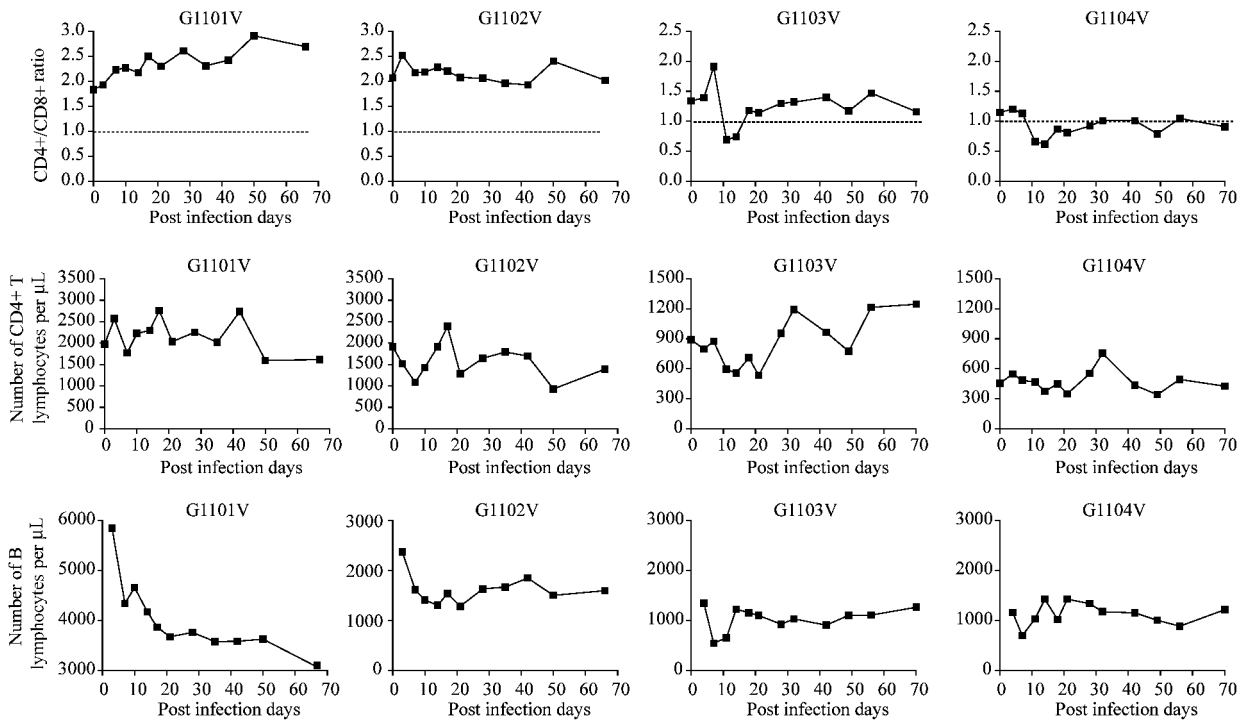


图 2 RT-SHIV 感染恒河猴的 CD4⁺/CD8⁺ 比值, CD4⁺ T 淋巴细胞和 B 细胞绝对数监测图

Fig. 2 Measurement of CD4⁺/CD8⁺ ratio, CD4⁺ T-cell and total CD20⁺ B-cell numbers following RT-SHIV infection

21 d 最低值 533 个/μL, 然后反弹上升; B 淋巴细胞绝对数由 4 d 的 1 348 个/μL 降到 7 d 的 547 个/μL, 然后 14 d 反弹回 1200 个/μL, 在此基础上徘徊。G1104V CD4⁺/CD8⁺ 细胞绝对数比值由 0 d 基

本值 1.15 下降到 14 d 的最低值 0.62, 后期一直在 1 左右波动; CD4⁺ T 淋巴细胞绝对数在急性期出现了一个下降趋势由 453 个/μL 降到 349 个/μL, 然后一直在 450 个/μL 左右徘徊; B 淋巴细胞绝对数由 4 d

RT-SHIV	LTEEKIKALUEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPUFAIKKKDSTKWRKLUDFRELNKRTQDFMEUQLGIPHPAGLKKKKSUTULDUGDAYFSUPLDEDFR	100
RT-SHIV(PBMC)	-----	100
1-21_RT	-----	100
2-28_RT	-----	100
3-21_RT	-----	100
3-56_RT	-----	100
4-21_RT	-----	100
4-56_RT	-----	100
RT-SHIV	KYTAFTIPSINNETPGIRVQYNULPQGKGSPIAFQSSMTKILEPFRKQNPDIUIVQYHDDL VUGSDLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEP	200
RT-SHIV(PBMC)	-----K-----I-----	200
1-21_RT	-----	200
2-28_RT	-----K-----	200
3-21_RT	-----K-----I-----	200
3-56_RT	-----K-----I-----	200
4-21_RT	-----K-----I-----	200
4-56_RT	-----K-----I-----	200
RT-SHIV	PFLMNGYELHPDKWTUQP IULPEKDSVTUND IQKLUGKLNWASIVPGIKURQLCKLLRGTALTEUIPLTEEALELAENREILKEPUHGUVYVDPKDL	300
RT-SHIV(PBMC)	-----	300
1-21_RT	-----	300
2-28_RT	-----	300
3-21_RT	-----	300
3-56_RT	-----	300
4-21_RT	-----	300
4-56_RT	-----	300
RT-SHIV	IAEIQKQCGQMTYQIVQEPFKMLKTKGYARMGAGHTNDUKQLTEAVQKITTESIUIWGKTPKFKLP IQKETWETWTEVQATWIPENEFUNTPPLUKL	400
RT-SHIV(PBMC)	-----	400
1-21_RT	-----	400
2-28_RT	-----	400
3-21_RT	-----	400
3-56_RT	-----	400
4-21_RT	-----	400
4-56_RT	-----	400
RT-SHIV	WYQLEKEPIUGAETFYVDGAANRETKLCKAGYVTHRCRQKUUULTDOTTNQTQLQIYVLALQDSGLEUNIUTDSQVALGI IQAQPDSSELUHQIIEQL	500
RT-SHIV(PBMC)	-----F-----	500
1-21_RT	-----	500
2-28_RT	-----	500
3-21_RT	-----	500
3-56_RT	-----	500
4-21_RT	-----	500
4-56_RT	-----	500

图 3 RT 基因氨基酸序列比对图

Fig. 3 RT amino acid sequence alignment

的 1 164 个/μL,在第 7 天下降到 698 个/μL,然后在 14d 反弹回 1100 个/μL,以后并在 1100 个/μL 的水平上波动(图 2)。

2.3 RT-SHIV 感染中国恒河猴后的 RT 基因突变情况

RT 基因和 RNase H 基因全长氨基酸数为 560 个,比对的序列为 RT 基因的 26-525 个氨基酸,碱基序列为 76-1575 位碱基。在碱基序列比对方面,303 位的 G-A,1188 位的 C-T 突变所有样本都存在,535 位的 G-A,558 位的 G-A 存在于除 1-21(表示的为 G1101V 第 21 天的样本,以下类推)外的所有序列,569 位的 C-T 存在于除 1-21 和 2-28 的所有序列,1281 位的 A-T 仅存在于 2-28 中。其中有义突变为 558 位,569 位和 1281 位,氨基酸分别产生了 E(谷氨酸)-K(赖氨酸),T(苏氨酸)-I(异亮氨酸),L(亮氨酸)-F(苯丙氨酸)的突变(图 3)。

3 讨论

RT-SHIV 中国恒河猴动物模型是为筛选逆转录酶抑制剂,并对其进行体内药效学评价提供的一个动物平台,同时还可用于研究逆转录酶基因的一系列耐药性突变问题。该模型的建立首先 RT-SHIV 需要能够感染中国恒河猴,RT-SHIV 病毒感染中国恒河猴这一指标我们已经完成,以 200 TCID₅₀ 感染,

在第 10 天检测到病毒载量,且最高峰值达 2×10^6 copies/mL。然而在第 42 天,病毒载量由阳转阴,即低于 1 000 copies/mL,这为我们接下来的给药提供了难题,现已检测不出病毒载量,便不知药物的效果如何。因而我们期待能有一种毒力更强的 RT-SHIV 感染中国恒河猴。

SHIV 病毒的猴体内传代是增强 SHIV 病毒毒力的一种常用方法,其主要原理是原始 SHIV 病毒株在感染恒河猴后,免疫系统对该种 SHIV 产生一系列的免疫反应以清除病毒,与此同时,SHIV 病毒自身会产生一些突变,以逃逸这种免疫压力。在经过这一系列的突变后 SHIV 病毒能够更好的感染同一物种。本实验使用的传代方式为急性期采取外周血体外扩增病毒,不同于使用感染猴全血直接传代,该种传代方法的好处是可以浓缩病毒,使其更好的发挥功用。但是这种方式非常复杂,且在细胞培养的过程中易发生突变。我们通过猴体传代来增强 RT-SHIV 病毒毒力,期望 RT-SHIV 病毒能在中国恒河猴体内长期维持一种高载量,为我们接下来的药效学评价研究提供基础。在对传代猴和原始感染猴检测指标的对比中我们发现,传代猴的 RNA 病毒载量出现的时间更早,维持的时间更长能维持到 70 d。且载量最高值也由原来的 2×10^6 copies/mL 提高到 6×10^6 copies/mL。对 CD4⁺/CD8⁺ 比值

的观察中我们可以看到,传代猴急性期出现了明显的倒置现象,而原始感染猴不是很明显。 $CD4^+T$ 淋巴细胞的减少趋势也更为明显。这些现象说明 RT-SHIV 病毒经过在体内的一次传代后已经具有适应中国恒河猴的体内环境的趋势。

对 RT-SHIV 病毒 B 淋巴细胞绝对数的监测过程中我们发现,初始感染 RT-SHIV 的恒河猴(G1101V,G1102V)的 B 淋巴细胞呈现出明显持续下降的趋势,这不同于文献报道 SHIV/SIV 病毒的 B 淋巴细胞在急性期下降,后期有反弹恢复的特征^[6]。传代恒河猴的 B 淋巴细胞绝对数在急性期出现一个暂时的急剧性下降后于 14 d 又反弹回原来的基础值,并未表现出和初始感染猴一样持续下降的趋势。在研究 B 淋巴细胞的过程中我们设置了一个用 SHIV-1157ipd3N4 感染的对照猴,同时监测他的 B 淋巴细胞发现其在感染急性期呈现明显的下降趋势,但是过完急性期后绝对数值又反弹回原来的数量(数据未提供)。文献报道称 RT-SHIV 感染的恒河猴会表现出 B 淋巴细胞的持续下降趋势,这是其主要特征之一^[7],这一趋势在我们的初始感染恒河猴中表现明显,而在传代猴中这一趋势发生了改变,表现出和 SHIV-1157ipd3N4 感染恒河猴相同的趋势,导致这一趋势改变的原因是什么,是否是病毒基因在传代过程中发生的改变而导致的,这些问题有待我们进行更为深入的研究去解决。

逆转录酶相关的基因为 RT 基因和 RNase H 基因,这两个基因由 1 680 个碱基决定,共编码 560 个氨基酸。在研究 RT 基因的突变过程中,由于 PCR 和测序等客观因素,我们只截取了存在高可信度的 500 个氨基酸进行分析研究。发现在病毒的感染阶段 RT 基因发生突变的几率较小,第一代感染猴 G1101V 和 G1102V 在 500 个氨基酸中仅出现了 2 个氨基酸突变,在二次传代猴 G1103V 和 G1104V 中也仅出现 2 个氨基酸突变,且该突变对整个病毒

的感染并无太大的影响,表明 RT-SHIV 的 RT 基因在感染和传代过程中保持相对稳定,这对于今后的药物评价和耐药性突变研究提供了基础条件。

参考文献:

- [1] Uberla K, Stahl-Hennig C, Bottiger D, et al. Animal model for the therapy of acquired immunodeficiency syndrome with reverse transcriptase inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(18): 8210-8214.
- [2] Jiang Y, Tian B, Saifuddin M, et al. RT-SHIV, an infectious CCR5-tropic chimeric virus suitable for evaluating HIV reverse transcriptase inhibitors in macaque models [J]. *AIDS Res Ther*, 2009, 6: 23.
- [3] Soderberg K, Denekamp L, Nikiforow S, et al. A nucleotide substitution in the tRNA (Lys) primer binding site dramatically increases replication of recombinant simian immunodeficiency virus containing a human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase [J]. *J Virol*, 2002, 76(11): 5803-5806.
- [4] North TW, Van Rompay KK, Higgins J, et al. Suppression of virus load by highly active antiretroviral therapy in rhesus macaques infected with a recombinant simian immunodeficiency virus containing reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Virol*, 2005, 79(12): 7349-7354.
- [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 RNA 拷贝数方法的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2006, 14(004): 271-275.
- [6] Kuhrt D, Faith SA, Leone A, et al. Evidence of early B-cell dysregulation in simian immunodeficiency virus infection: rapid depletion of naive and memory B-cell subsets with delayed reconstitution of the naive B-cell population [J]. *J Virol*, 84(5): 2466-2476.
- [7] Hofman MJ, Higgins J, Matthews TB, et al. Efavirenz therapy in rhesus macaques infected with a chimera of simian immunodeficiency virus containing reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(9): 3483-3490.

(修回日期) 2010-09-29