

# 猴免疫缺陷病毒(SIV)感染恒河猴 血液学和血液生化的动态变化

孙丽华<sup>1</sup>, 卢耀增<sup>1</sup>, 吴小闲<sup>1</sup>, 马耀文<sup>1</sup>, 孙井江<sup>1</sup>, 潘菊华<sup>2</sup>, 王 阶<sup>2</sup>, 黄世敬<sup>2</sup>

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病三级实验室, 北京 100021; 2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

**【摘要】 目的** 探讨 SIVmac239 感染中国恒河猴的血液学和血清生物化学的变化, 研究艾滋病的发生机制。**方法** 20 只恒河猴感染 SIVmac239 后分别在感染前和感染后 2、6、9、12、15 和 18 个月在猴空腹状态用盐酸氯胺酮麻醉下静脉采血。抗凝血用全自动血液细胞分析仪检测血液常规, 血清用全自动生化分析仪检测生化指标。**结果** SIV 感染猴红白细胞计数呈逐渐的减少。淋巴细胞计数有较明显减/增的波动。血清酶类 ALT 和 AST 没有明显的上升, 但在 15 月时均有所下降  $P < 0.05 \sim P < 0.01$ 。LDH 持续降低, 原因未明。CK 则逐月上升, 至 12 月时达高峰, 后又有所下降。血尿素氮逐月上升, 并在 6~18 个月时  $P < 0.01$ 。总蛋白量上升, 白蛋白逐月降低, 球蛋白升高, 白蛋白/球蛋白比率倒置。SIV 感染猴 2 个月后总胆固醇、甘油三脂、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白均呈上升, 至 12 月时略有下降, 但到 18 月又上升。血糖 (GLU) 在 SIV 感染后逐月上升, 后期上升更为明显, 这可能与胰岛的损害有关。**结论** SIVmac239 感染猴后, 通过 SIV 侵入相关的器官病变和体液调节失衡导致血液学和血液生物化学产生异常, 从而提供有关猴艾滋病的一些基础资料, 这将对研究人的艾滋病也许有所帮助。

**【关键词】** SIVmac239 病毒; 血液学和血液生物化学

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)06-0009-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.06.003

## Dynamic Changes of Haematological and Blood Biochemical Values in SIV-infected Rhesus Monkeys

SUN Li-hua<sup>1</sup>, LU Yao-zeng<sup>1</sup>, WU Xiao-xian<sup>1</sup>, MA Yao-wen<sup>1</sup>, SUN Jing-jiang<sup>1</sup>, PAN Ju-hua<sup>2</sup>, WANG jie<sup>2</sup>, HUANG Shi-jing<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine of Ministry of Health, Laboratory of Human Diseases Animal Model of State Administration of Traditional Medicine. Institute of Medical Laboratory Animal Science, CAMS and PUMC, Beijing 100021, China. 2. Guang An Men Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053, China)

**【Abstract】 Objective** The aim is to explore the hematological and the blood biochemical values in SIV infected monkeys for the investigation of pathogenesis of SIV/HIV. **Methods** 20 Chinese rhesus monkeys were inoculated with SIVmac 239 intravenously, and the blood samples were taken from monkeys in 2, 6, 9, 12, 15 and 18 months under anesthesia with ketamine hydrochloride. The anticoagulant blood was used for blood routine by Beckman Coulter Ac. T5 diff, and the serum was analyzed for biochemical elements by the use of Hitachi 7020 automatic analyzer. **Result** The total count of erythrocyte and leukocyte revealed to be decreased slowly but the count of lymphocyte fluctuated up and down

[基金项目] 国家科技重大专项(2008ZX10005-004)资助。

[通讯作者] 卢耀增, 教授, E-mail: lyz\_wxx@163.com。

between  $52.1 \pm 13.1\%$  and  $32.8 \pm 14.2\%$ . ALT and AST did not appeared to be increased, but at the time of 15 months they increased  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ . LDH decreased but the cause is unknown. CK increased steadily to the summit in 12 months then it fell down. The BUN increased step by step monthly to 6 ~ 18 months  $P < 0.01$ . The total protein increased but the albumin decreased, the ratio of A/G was inversed. Total cholesterol, triglyceride, HDL and LDL increased but they decreased in 12 months. Blood glucose increased monthly, it may be related to the damage of pancreatic islet in SIV infected monkeys. **Conclusion** By the use of SIV infected monkeys more organs suffered with pathological changes and dysfunction of body liquid, some haematological and blood biochemical values appeared to be abnormal, by which it would be presented some useful data for the investigation of pathogenesis of SIV/HIV.

**【Key words】** SIVmac239 virus; Hematology and blood biochemistry

SIV 感染的恒河猴是研究人类 HIV/AIDS 的最好动物模型,曾被联合国卫生组织一个专家组誉为“黄金标准”<sup>[1]</sup>。猕猴艾滋病模型可供研究艾滋病疫苗的研制、抗艾滋病药物药理学和毒理学研究,也可作为艾滋病死亡机制和愈合机制的探讨。通过我们多年的艾滋病研究工作,认识到猴艾滋病不单是免疫系统疾病,而且还是神经系统和内分泌系统缺损综合征。还可以殃及心、肝、肾、消化道和眼等器官<sup>[2]</sup>。临床上早已诊疗神经系统艾滋病痴呆,认知能力减退,运动失调疾病。内分泌系统也诊疗闭经、阳痿等。有关 HIV/AIDS 病人的血液常规和血液生物化学的变化已有一些学者作了报导。Maty'skova M 等报导,64 名被诊为 HIV-1 感染者其所有血液细胞计数平均值居于正常范畴,但 CD4 + 淋巴细胞则低于正常参考范围<sup>[3]</sup>。Wohl 等<sup>[4]</sup>观察 HIV 男性感染者,他们甘油三脂较高和低密度脂蛋白较低。张自华等<sup>[5]</sup>对 129 例 HIV/AIDS 病人血清蛋白分析,白蛋白严重下降,球蛋白升高,白蛋白/球蛋白比严重倒置。由此可见对 HIV/AIDS 病者血液细胞计数和血液生化检查对病情的了解、治疗的情况和预后均有重要意义。我们应用猴 SIV/SAIDS 模型进行各个时相连续观察其血液细胞计数和血液生化的变化,并与猴病情和各阶段病理组织学变化联系,这能较确切的了解猴艾滋病的病情,对猴艾滋病的发生、发展和预后有一定参考作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

中国恒河猴(7-13 岁),雌雄各半,共 20 只,体重  $4.76 \sim 8.76$  kg。购自北京协尔鑫生物资源研究所(Institute of Beijing XIEERXIN Biology Resource),许可证编号:SCXK(京)2005-0005,动物使用许可 SYXK(京)2009-0003。实验方案的到中国医学科学院实验动物研究所实验动物管理和使用委员会认

可(IACUC-MC-08-6003)试验前经检查无 SIV、逆转录病毒 D 型(SRV)和猴淋巴细胞 T 趋向性毒 1 型(STLV-1)抗体,饲养在生物安全环境下用于试验。

### 1.2 标本来源和采集

SIVmac239 猴艾滋病病毒,美国 Aaron Diamond 艾滋病研究所 Marx PA 教授赠送。经用中国恒河猴 PBMC 体外扩增的病毒液,滴度  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL,用 1:50 稀释 1mL 静脉注射上述 20 只中国恒河猴。分别取感染前和感染后 2、6、9、12、15 和 18 个月的血进行测定,实验猴(空腹)在盐酸氯胺酮麻醉下静脉采血,抗凝血用于血常规测定,血清用于血液生化测定。

### 1.3 样品检测

均由本所 GLP 研究室测定

1.3.1 血液常规:红细胞(RBC)、白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYM)用全自动血液细胞分析仪 Beckman Coulter Ac. T 5 diff 测定。仪器购自美国贝克曼库尔特实验系统有限公司。

1.3.2 血液生化:用全自动血液生化分析仪 Hitachi 7020 Automatic Analyzer 测定。仪器购自日本日立高新技术公司。

血生化测定酶类:谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、谷氨酰基转移酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH),以上均用速率法测定,试剂盒购自日本世诺临床诊断制品株式会社。肌酐(CRE)用苦味酸法、尿素氮(BUN)用酶两点动力学法,总胆红素(TBIL)用钒酸盐法,肌酸激酶(CK)用连续监测法,以上试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司。

血蛋白质类:血清总蛋白(TP)用双缩尿法、血清白蛋白用溴甲酚绿法,以上试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司。

血脂类:胆固醇(CHO)和甘油三酯(TG)用酶比色法,高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白

(LDL)用清除法,以上试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司。

血糖(GLU)用葡萄糖氧化酶法,试剂盒同上。

#### 1.4 统计方法

采用 SPSS 统计软件对不同时间点的各项参数与感染前均值进行比较。独立样品 *t* 检验分析,求出 *P* 值, *P* < 0.05 有差异, *P* < 0.01 有显著差异。

## 2 结果与分析

SIVmac239 感染中国恒河猴分别在感染前和感染后不同时间取血测定其血常规和生化指标,用血液学和生物化学来反应艾滋病引起相关脏器的病变。本实验用 20 只猴做指标,实验过程中定期安乐死猴和自然死亡猴做病理观察,所以后期猴子数量减少。从上结果看 SIVmac239 感染中国恒河猴感染前和感染后是有差异的,有些指标具有统计学上的意义。

### 2.1 血液学变化

红细胞(RBC)、白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYM)在 SIVmac239 感染恒河猴中,红细胞总数随着实验时间的延长逐渐减少。白细胞总数在实验过程中有极轻度下降。淋巴细胞在 2 和 15 个月均有所下降,并在 15 个月时 *P* < 0.05。Phillips A N 等曾进行了 CD4 + 淋巴细胞计数,以淋巴细胞计数测定 HIV 血清转化为 AIDS 的时间,和推算死亡时间<sup>[6]</sup>。SIV 艾滋病猴一旦发生机遇感染或出现自身免疫反应时,其淋巴细胞的数量就有明显的降低。见图 1。

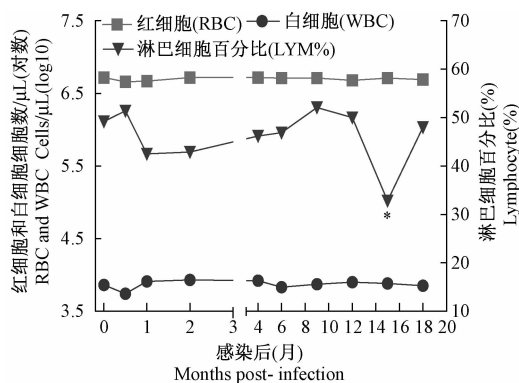


图 1 血常规曲线图

Fig. 1 Curves of blood routine

### 2.2 酶类的变化

血清肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰转氨酶(GGT)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素

(TBIL)。见图 2 和图 3。

(1)ALT 和 AST 在猴感染 SIV 后血清酶没有升高而是处于实验前水平以下,ALT 在 15 月下降 3~4 倍 *P* < 0.01。AST 在 15 月也有所下降 *P* < 0.05。从上述测定结果分析,SIV 猴尚未激发两酶的升高。Huang CM 等<sup>[7]</sup>年进行了 HIV、AIDS 和对照者的葡萄糖-6 磷酸酶异构体、AST、ALT 和 LDH 的检测,这些酶谱显示对照组低,HIV 感染者升高。而 AIDS 患者上升比 HIV 高 1 倍,随着病情进展这些酶也将逐渐升高。但作者提到在 AIDS 病人中 90% 具有乙型和丙型肝炎病毒的抗体。

(2)GGT 在感染 SIV 后和感染前比较平稳,只在 18 个月才上升。GGT 上升的原因见于肝硬化、胆道感染和胰腺炎等。在尸检病理切片观察到 SIV 感染猴 18 月时,胰岛数量明显减少,有少数胰腺炎和胰岛细胞变性的改变,是否能导致 GGT 上升有待进一步探讨。

(3)LDH 和 CK LDH 在感染 SIV 猴后持续降低,特别是 6、15 和 18 个月降低明显, *P* < 0.01,降低原因有待进一步查找。CK 则逐月上升,至 12 个月达高峰,但在 15、18 个月时逐渐下降。CK 在心肌梗塞、病毒性心肌炎、脑血管意外、脑组织损伤时都上升。SIV 感染猴有 8 只猴患有灶性心肌炎,心肌细胞固缩、红染、肌纹消失和心肌细胞核增大现象,可能是 CK 增高的部分原因。Kellg 等<sup>[8]</sup>观察 SIV 感染猴超声心电图异常,猴的心功能受损。SIV 在心肌和心肌吞噬细胞内复制导致心肌细胞受损而出现心舒张的功能障碍。Terio KA 等<sup>[9]</sup>用 SIV 接种了猩猩后,在尸检中见到心肌巨核细胞症和心肌间质纤维化等改变。

(4)ALP 在感染 SIV 猴呈逐月减少,只在 6 月时略有上升,而在 9 月时则明显下降 *P* < 0.01。

(5)TBIL 感染 SIV 猴的 TBIL 各个时间点均较感染前有所下降,且在 6 和 9 个月时下降明显 *P* < 0.01。在 15 和 18 个月时略有上升,总胆红素的升高与肝、胆疾病有关。SIV 猴只有个别猴出现轻度胆囊炎和肝的围管浸润,还不足以引起肝对总胆红素代谢的改变。

### 2.3 血尿素氮(BUN)和血肌酐(CRE)的变化

BUN 在 SIV 感染后 2 月就开始逐渐升高,且 6 月~18 月升高 *P* < 0.01。BUN 是肾小球的过滤功能的指征。如肾小球过滤率下降 50% 将会出血尿素的上升。在 SIV 猴肾小球随着 SIV 在体内感染

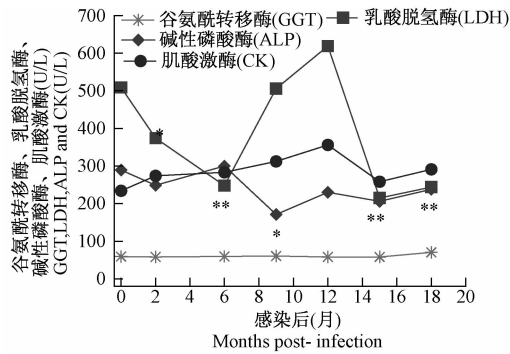


图2 CK、LDH、ALP 和 GGT 指标曲线图

Fig. 2 Curves of CK, LDH, ALP and GGT

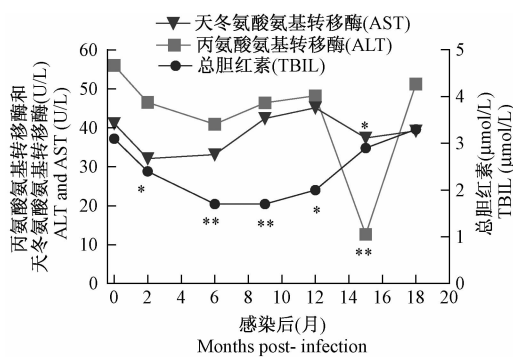


图3 AST、ALT 和 TBIL 指标曲线图

Fig. 3 Curves of AST, ALT and TBIL

时间的延长,其免疫复合物沉积肾小球血管基底膜逐渐增加,影响肾小球的过滤,导致 BUN 升高。Purswani MU 等提出儿童和成人感染 HIV 引发的慢性肾病是由于不同的免疫复合物介导引发肾小球肾炎<sup>[10]</sup>。Medapalli RK 等认为 HIV 相关的肾病是由于 HIV-1 病毒基因特别是 Nef 和 Vpr 在感染宿主肾上皮细胞从而演化复制,宿主的多条细胞通道失去调控,包括细胞的分裂周期和凋亡通道形成持续的 HIV 肾组织病理学综合征<sup>[11]</sup>。CRE 在 SIV 感染后 2、6、12 个月均下降  $P < 0.01$ , 15 个月有所回升。CRE 与肾的排泄能力和肾小球的过滤率下降有关。见图 4。

## 2.4 血蛋白的变化

总蛋白(TP)在 2、6、9、12、15 个月均较感染前有所升高,且有统计学意义。白蛋白(ALB)除感染 15 月时略有升高外,其它感染时间点均较感染前降低,并在 9 和 12 个月有显著差异  $P < 0.01$ 。球蛋白(GLO)感染后均较感染前有所升高  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ , A/G 比率降低,由于白蛋白降低和球蛋白升高所致。见图 5。

在 SIV 进入猴体 1 个月后,猴的抗体 IgG 不断

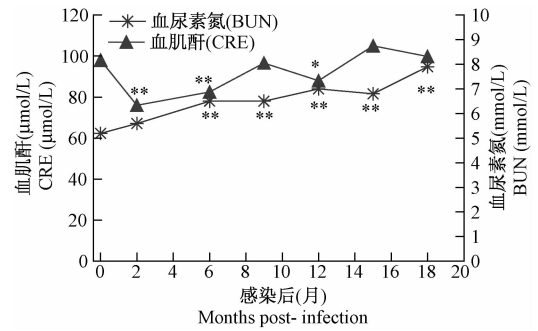


图4 血尿素氮和血肌酐曲线图

Fig. 4 Curves of blood urea nitrogen and creatinine

上升,免疫球蛋白的不断增加,这是机体体液免疫反应的表现。在本实验中#449 猴 4.5 个月死亡前,其 IgG 低至测不出,缺乏 SIV 病毒抗体,免疫功能极低,机遇感染而死亡。Graham SM 等认为生化血清蛋白减少与 HIV-1 病毒致病有关<sup>[12]</sup>。Mehta SH 等提出血清蛋白指标可以作为 HIV 疾病进展、治疗、预后的评估<sup>[13]</sup>。

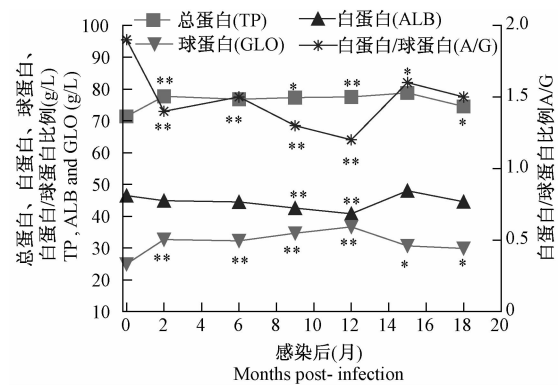


图5 血蛋白曲线图

Fig. 5 Curves of blood proteins

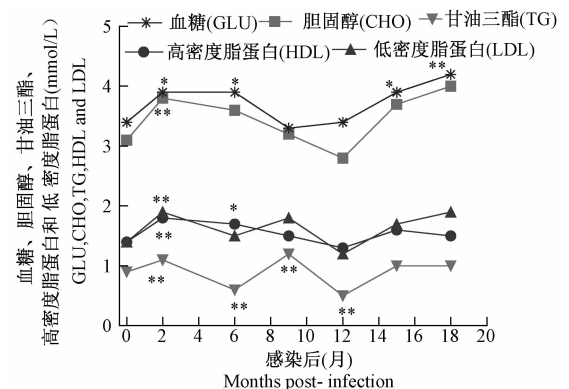


图6 血糖和血脂曲线图

Fig. 6 Curves of blood glucose and lipids

## 2.5 血脂的变化

在猴感染 SIVmac239 后 2 个月总胆固醇

(CHO)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)就较感染前有所上升,并有统计学意义  $P < 0.01$ 。但在 12 个月时总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白有轻微降低,而到 18 月时又升上去。其上升和下降的幅度均较小(图 6)。Salami AK 等(2009)在 327 例艾滋病高脂病人进行蛋白酶抑制剂(PI)和非核苷转录酶抑制剂(NNRTI)治疗。治疗前后对比发现,经两种抗艾滋病药物治疗后,病人的血脂指标比治疗前高<sup>[14]</sup>。

有关 HIV/AIDS 病人血脂升高,低密度脂蛋白上升,高密度脂蛋白降低是否与脑垂体中间部和远侧部的细胞分泌的促脂素细胞有关。Richter WO 等进行了多肽促脂素的试验,促脂素能动员脂质,对兔脂肪组织的匀浆能够递降和分解。说明促脂素对脂质有降解作用<sup>[15]</sup>。

## 2.6 血糖 (GLU) 的变化

感染 SIVmac239 猴在 2 月时测血糖值已开始升高,除在 9 个月时略有降低外,而在 18 月时上升更为明显。统计学处理表明 2、6、12、18 个月均有显著差异(见图 6)。从 SIV 猴胰脏切片观察胰岛的数目和(细胞形态,随着病程进展而逐渐减少。因而糖的代谢受到直接的影响引发血糖的升高。

### 参考文献:

- [ 1 ] Espargaza J and osmanov S. A summary of WHO informal consultation on animal models for evaluation deugs anvaceunes for HIV infection and Alds ( Geneva, 14 - 15. septumber1989). in schelekens H and Hanzinele MC eti. animal models in AIDS [ M ]. Elsevin, amsteidam 1990. 21 - 22.
- [ 2 ] 卢耀增,吴小娟,陈颂等. 灵芝制剂治疗猴获得性免疫缺陷综合征的疗效观察[J]. 中国医学科学院学报,2011,6(3):332
- [ 3 ] Matyskova M, Snopkova S. HIV/AIDS and pathology in blood count[J]. Cas Lek Cesk. 2007,146(1)68 - 73.
- [ 4 ] Wohl D, Scherzer R, Heymsfield S, et al. The associations of regional adipose tissues with lipid and lipoprotein levels in HIV-infected men. [ J ]. Acquir Immune Defic Syndr. 2008,48(1): 44 - 52.
- [ 5 ] 张自华,孔群智,孔山. 129 例 HIV 感染者血清蛋白分析[J]. 海南医学,2010,21(3).
- [ 6 ] Phillips AN, Pezzotti P, Lepri AC, et al. CD4 lymphocyte count as a determinant of the time from HIV seroconversion to AIDS and death from AIDS: evidence from the Italian Seroconversion Study . [ J ]. J AIDS. 1994,8(9):1299 - 305.
- [ 7 ] Huang CM, Ruddel M, Elin RJ. Enzyme abnormalities of patients with acquired immunodeficiency syndrome. [ J ]. Clin Chem. 1988,34(12):2574 - 6.
- [ 8 ] Kelly KM, Tarwater PM, Karper JM, et al. Diastolic dysfunction is associated with myocardial viral load in simian immunodeficiency virus-infected macaques . [ J ]. AIDS. 2012, 24;26(7):815 - 23.
- [ 9 ] Terio KA, Kinsel MJ, Raphael J, et al. Pathologic lesions in chimpanzees ( pan troglodytes schweinfurthii ) from Gombe National Park, Tanzania, 2004 - 2010. [ J ]. J Zoo Wildl Med. 2011,42(4):597 - 607.
- [ 10 ] Purswani MU, Chernoff MC, Mitchell CD, et al. Chronic kidney disease associated with perinatal HIV infection in children and adolescents. [ J ]. Pediatr Nephrol. 2012,27(6):981 - 989.
- [ 11 ] Medapalli RK, He JC, Klotman PE. HIV-associated nephropathy: pathogenesis. [ J ]. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2011,20(3):306 - 11.
- [ 12 ] Graham SM, Holte S, Kimata JT, et al. A decrease in albumin in early SIV infection is related to viral pathogenicity [ J ]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2009,25(4):433 - 40
- [ 13 ] Mehta SH, Astemborski J, Sterling TR, et al. Serum albmin as a prognostic indicator for HIV disease progression [ J ]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2006,22(1):14 - 21
- [ 14 ] Salami AK, Akande AA, Olokoba AB. Serum lipids and glucose abnormalities in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapies. [ J ]. Pediatr Nephrol. 2012,27(6):981 - 989.
- [ 15 ] Purswani MU, Chernoff MC, Mitchell CD, et al. Chronic kidney disease associated with perinatal HIV infection in children and adolescents. [ J ]. Pediatr Nephrol. 2012,27(6):981 - 989.

[ 修回日期 ] 2012-05-08