

SIVmac239 毒株经静脉及直肠感染中国恒河猴的比较

陈 颂^{1,2}, 赖春辉¹, 吴小闲¹, 卢耀增¹, 卢 葳³

¹中国医学科学院 北京协和医学院 实验动物研究所, 北京 100021

²中国医学科学院 北京协和医学院 基础医学研究所细胞生物室, 北京 100005

³法国发展研究院 145 研究所中国部, 北京 100730

通信作者: 吴小闲 电话: 010-67779700, 电子邮件: lyz_wxx@163.com

摘要: **目的** 研究猴免疫缺陷病毒 SIVmac239 毒株经静脉及直肠途径感染中国恒河猴后的生物学特性和症状表现, 并比较由感染途径不同导致的差异, 为该模型系统的应用提供依据。 **方法** 以 SIVmac239 毒株经静脉感染 19 只中国恒河猴, 经直肠感染 6 只中国恒河猴, 观察至感染后 232 或 168 d, 比较其抗猴免疫缺陷病毒 (SIV) 特异性抗体滴度、CD4 + T 细胞数量、血浆病毒载量、淋巴结病理改变以及临床表现的变化。 **结果** 所有猴均出现 SIV 抗体阳转。在静脉感染猴, 感染后 10 d 检测到 SIV 特异的 IgM, 而直肠感染猴始终未能检测到。在感染后 168 d, 静脉感染猴的 SIV 特异性 IgG 的平均水平较直肠感染猴高 10 倍。在观察期内, 直肠感染组的 CD4 + T 细胞数下降不如静脉感染组显著。所有猴的血浆 SIV 载量均在感染后 10 ~ 14 d 达到高峰 (10^7 拷贝/ml 左右), 约 2 个月后降至平台期 ($10^3 \sim 10^6$ 拷贝/ml)。2 只静脉感染猴及 1 只直肠感染猴在感染后 150 ~ 210 d 死于猴免疫缺陷综合征, 呈快速进展型改变。 **结论** SIVmac239 毒株静脉及直肠感染接种中国恒河猴, 均可建立慢性的 SIV 感染, 其特征与人感染人类免疫缺陷病毒后的改变相似, 均可以作为良好的研究获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 的动物模型, 尤其有助于预防性或治疗性 AIDS 疫苗的研究。

关键词: 猴免疫缺陷病毒; SIVmac239; 中国恒河猴

中图分类号: R512.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2008)02-0156-05

Comparison of Intravenous and Intrarectal SIVmac239 Infections in Rhesus Monkeys of Chinese Origin

CHEN Song^{1,2}, LAI Chun-hui¹, WU Xiao-xian¹, LU Yao-zeng¹, LU Wei³

¹Institute of Laboratory Animal Science, CAMS and PUMC, Beijing 100021, China

²Department of Cell Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

³French Institute of Research for the Development (IRD)-UMR 145 China Branch Room, Beijing 100730, China

Corresponding author: WU Xiao-xian Tel: 010-67779700, E-mail: lyz_wxx@163.com

ABSTRACT: Objective To investigate the biological and clinical features of Chinese rhesus monkeys after intravenous (IV) and intrarectal (IR) challenge with SIVmac239 in rhesus monkeys of Chinese origin, and compare the differences between the routes of infection. **Methods** Rhesus monkeys of Chinese origin were inoculated with SIVmac239 either by IV ($n = 19$) or IR ($n = 6$) routes. Simian immunodeficiency virus (SIV)-specific antibody titer, CD4 + T cell counting, plasma SIV load, lymph node pathology, and clinical manifestations were compared between these two groups 232 or 168 days after challenging. **Results** All SIVmac239-inoculated animals became seropositive for SIV-specific antibodies. SIV-specific IgM was detected in IV groups as from day 10 but was not detected in IR for all the time points. Although SIV-specific IgG was detected as from day 30 in both groups, the IgG titers were ten-fold higher in IV group than in IR group after day 168. CD4 + T-cell counting decreased progressively in IV group but remained stable in IR group over time. Plasma

SIV RNA loads peaked in all animals between day 10 and day 14 (10^7 copies/ml), then declined to “set-point” ($10^3 \sim 10^6$ copies/ml) about 2 months later. Most inoculated animals manifested lymphadenopathy. Two animals in IV group and one in IR group died of simian AIDS between day 150 and day 210, as evidenced by the autopsies showing the depletion of lymph tissues, Pneumocystis carinii pneumonia and other opportunity infections. **Conclusion** IV or IR inoculation of SIVmac239 in Chinese rhesus monkeys will result in chronic SIV infection with a similar clinical feature of natural HIV infection, which provides an excellent experimental animal model for AIDS.

Key words: simian immunodeficiency virus; SIVmac239; rhesus monkey of Chinese origin

Acta Acad Med Sin, 2008,30(2):156-160

猴免疫缺陷病毒 (simian immunodeficiency virus, SIV) 感染的猴模型被广泛应用于抗人获得性免疫缺陷综合征 (acquired immunodeficiency syndromes, AIDS) 药物、疫苗免疫调节剂以及人免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染免疫学、病毒学等方面的研究。在猴种的选择上, 目前国际上较为普遍采用的是印度恒河猴, 但此模型在病毒载量、病程、抗体水平等重要参数上与人 HIV 感染有较大差异。而中国恒河猴模型被认为与 HIV 感染更为接近, 但尚缺乏足够的实验数据支持^[1,2]。本研究采用 SIVmac239 毒株, 对中国恒河猴进行静脉感染与直肠感染, 了解其感染中国恒河猴后各项指标的变化规律, 并对这两种感染途径进行初步比较, 为这两个系统应用于 HIV 黏膜感染、黏膜免疫以及疫苗的研究提供依据。

材料和方法

实验动物 中国恒河猴 25 只, 购于广东省高要市康达实验动物科技有限公司 [证号: SCXK (粤)-2004-0009], 其中雄性 11 只、雌性 14 只; 体重 5 ~ 7 kg。经血清学检测猴逆转录 D 型病毒 (simian type D retrovirus, SRV)、SIV 和猴 T 淋巴细胞性 I 型病毒 (simian T-cell lymphotropic virus type I, STLV-I) 抗体阴性, 结核菌素实验阴性。感染前无淋巴结肿大, 血常规无异常改变。

感染毒株和剂量 SIVmac239 病毒液由美国 Aaron Diamond 艾滋病研究中心 Marx 教授馈赠。实验采用原始病毒液和经过正常猴外周血单个核细胞体外扩增得到的 SIVmac239 病毒。以 3 200 个半数培养感染剂量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 经静脉感染 19 只中国恒河猴 (雄性 10 只、雌性 9 只); 以 $10^4 \sim 10^5$ 个 TCID₅₀ 的剂量经直肠感染 6 只中

国恒河猴 (雄性 1 只、雌性 5 只)。

常规观察 观察实验猴感染后饮食、体重的变化, 以及淋巴结触诊、腹泻等临床症状及体征的改变。静脉感染组共观察 232 d, 直肠感染组共观察 168 d。

SIV 特异抗体的检测 采用间接免疫荧光法。用 SIVmac239 感染的 CEMx174 细胞 (美国 Aaron Diamond 艾滋病研究中心 Marx 教授馈赠) 制成抗原片, 将经梯度稀释的灭活待测血浆与之孵育后, 用异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的抗猴 IgG 抗体 (Sigma) 作为检测抗体; 孵育后洗去未结合的游离抗体, Olympus 荧光显微镜下观察。FITC 标记的抗人 IgM 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司) 经证实与猴 IgM 有交叉反应性, 操作方法与 IgG 检测相同。

血常规和淋巴细胞亚群的检测 血常规用 Beckman-Coulter Ac. T 5 diff 血细胞分析仪进行检测。抗人 CD4-FITC 单抗购自北京大学医学院免疫室 (经预实验证实与恒河猴有交叉), CD3-PE (clone SP34)、CD8 PE-Cy5 (clone RPA-T8) 购自 BD Pharmingen 公司, 用 BD FACS Calibur 流式细胞仪检测, 并根据白细胞数及淋巴细胞比例的结果计算 CD4 + T、CD8 + T 细胞的绝对值。

血浆病毒载量的测定 采用 RT-PCR 及 TaqMan 探针法, 引物及探针序列见文献 [3], 用 ABI 7500 real-time PCR 仪进行反应及检测。

淋巴结活检 动物经氯胺酮麻醉后, 无菌手术从腋下或腹股沟取淋巴结, 经 10% 中性福尔马林固定后, 常规石蜡包埋、切片及 HE 和 Masson 染色, 镜下观察。

尸检 对濒死实验猴实施安乐死, 取呼吸、消化、循环、免疫、神经、内分泌等系统的脏器作病理学检查。

统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件 One-Way ANOVA 模块进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

结 果

临床症状 分 3 次感染的恒河猴共 25 只，大多在感染后 2 周出现体表浅淋巴结肿大。其中静脉感染猴中 2 只 (M329、M330) 分别在感染后 156 和

210 d 死亡，直肠感染猴中 1 只 (M332) 在感染后 178 d 死亡。

SIV 特异性抗体 SIV 特异性 IgG 抗体在感染后 14 d 未能检测出，在 30 d 左右出现较低滴度的抗体 (1:40 ~ 1:160)。静脉感染猴在 76 d 及以后出现高滴度的抗体，而直肠感染猴的 IgG 抗体水平始终较低 (表 1)。静脉感染猴在感染后 10 d 检测到 SIV 特异 IgM，几何平均滴度为 74.4，而直肠感染猴在所有时间点均未能检测到 IgM。

表 1 抗 SIV IgG 抗体几何平均滴度
Table 1 Titer of SIV specific IgG antibody (geometric mean)

感染途径 Infection routes	n	感染后天数 Days post-infection				
		14	28	70	133	168
静脉 Intravenous	19	UD	80.0	923.7	1 228.9	11 573.4
直肠 Intrarectal	6	UD	160.0	761.1	1 280.0	1 280.0

SIV: 猴免疫缺陷病毒; UD: 未测出

SIV: simian immunodeficiency virus; UD: undetermined

血常规和淋巴细胞亚群 SIVmac239 经静脉或直肠感染后第 14 天，出现不同程度的淋巴细胞比例增加和白细胞数减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，之后逐渐恢复，并在一定范围内波动 (表 2, 3)。

SIVmac239 经静脉感染后，CD4 + T 细胞数在急性期下降较为迅速，之后维持于较低水平并有下降

趋势。而经直肠感染的实验猴 CD4 + T 细胞数在急性期明显减少后快速回升，并较长时间维持于一较高水平，至 168 d 回落，但与感染前比较差异无显著性，且个体之间的差异大于静脉感染。CD8 + T 细胞在静脉及直肠感染后均出现一定程度的升高，然后逐渐降低 (图 1)。

表 2 SIVmac239 静脉感染中国恒河猴白细胞数和淋巴细胞比例的变化
Table 2 Changes of WBC and LYM in intravenously SIVmac239-infected Chinese rhesus monkeys

项目 Items	感染后天数 Days post-infection					
	0	14	30	76	160	232
n	19	19	19	19	18	10
WBC ($\times 10^9/L$)	7.37 ± 1.92	5.76 ± 1.80	7.64 ± 2.96	6.14 ± 1.66	6.66 ± 1.97	7.34 ± 3.38
LYM (%)	41.1 ± 11.7	58.3 ± 14.3**	40.1 ± 10.8	58.9 ± 10.7**	58.4 ± 13.5**	48.5 ± 10.4

WBC: 白细胞; LYM: 淋巴细胞比例; 与感染前比较, ** $P < 0.01$

WBC: white blood cell; LYM: lymphocytes subsets; ** $P < 0.01$ compared with pre-infection

表 3 SIVmac239 直肠感染中国恒河猴白细胞数和淋巴细胞比例的变化
Table 3 Changes of WBC and LYM in intrarectally SIVmac239-infected Chinese rhesus monkeys

项目 Items	感染后天数 Days post-infection							
	0	14	28	48	70	106	133	168
n	6	6	6	6	6	4	4	4
WBC ($\times 10^9/L$)	8.65 ± 2.82	4.62 ± 1.70*	8.82 ± 3.34	11.93 ± 3.28	9.95 ± 3.37	11.43 ± 3.83	9.12 ± 3.37	11.63 ± 4.43
LYM (%)	43.6 ± 11.2	58.5 ± 13.1	43.6 ± 15.6	33.5 ± 11.6	45.3 ± 14.7	59.0 ± 4.8	57.8 ± 10.8	45.0 ± 19.0

与感染前比较, * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ compared with pre-infection

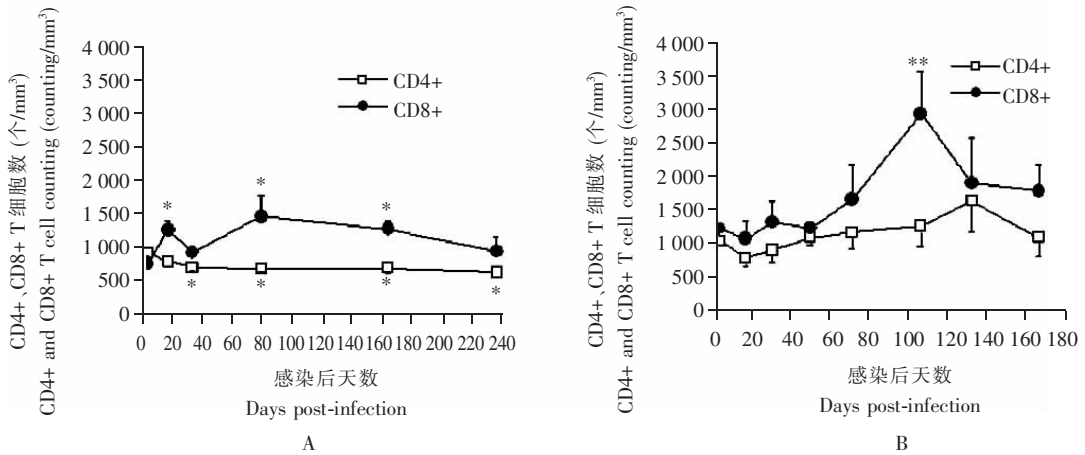


图1 SIVmac239 经静脉 (A) 或直肠 (B) 感染后 CD4 +、CD8 + T 细胞数的变化

Fig 1 Changes of CD4 + and CD8 + T-cell counting after intravenous (A) and intrarectal (B) SIVmac239 infection 与感染前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with pre-infection

从个体来看, 在静脉感染的 19 只实验猴中, 9 只 (47.4%) 猴的 CD4 + T 细胞数在感染后 232 d 内降低至低于 $500 \text{ 个}/\text{mm}^3$, 其中 3 只 (15.8%) 低于 $300 \text{ 个}/\text{mm}^3$ 。M329 猴在感染后 30 d 时 CD4 + T 细胞数即迅速降低至低于 $300 \text{ 个}/\text{mm}^3$ 。另有 6 只猴呈缓慢下降趋势, 但未低于 $500 \text{ 个}/\text{mm}^3$; 4 只猴 (21.1%) 在感染后 8 个月的观察期内 CD4 + T 细胞数始终未下降, 稳定于一定的波动范围内。而直肠感染的 4 只猴在感染后 8 个月的观察期内均未出现明显的 CD4 + T 细胞减少, 仅 1 只在急性期出现了超过 50% 的下降, 之后迅速回升至感染前水平, 至感染后 168 d 仍 $> 500 \text{ 个}/\text{mm}^3$ 。

血浆病毒载量 在感染后 10 ~ 14 d, 经静脉或直肠感染的恒河猴血浆病毒载量均达到高峰, 然后迅速下降, 并从 41 ~ 76 d 开始维持于平台期 (set point)。静脉和直肠感染达到峰值及平台期的时间、平台期的病毒载量差异均无显著性 (图 2)。

快速进展型: 经静脉感染的 M329、M330 和经直肠感染的 M332 在感染后半年左右死亡, 呈现较典型的快速进展型的特征。此 3 只猴的病毒载量在高峰期和平台期均较平均值高, 高峰期均在 5×10^7 拷贝/ml 以上, 甚至超过 10^8 拷贝/ml; 而平台期稳定于 10^6 拷贝/ml 以上, 甚至超过 10^7 拷贝/ml。抗体水平相对较低, 如猴 M329, 仅为平均值的 1/100。除 M332 猴外, CD4 + T 细胞数下降显著, 如猴 M329 在 80 d 即降到 $200 \text{ 个}/\text{mm}^3$ 。病理检查显示淋巴组织呈严重退化、耗竭的改变 (图 3)。

病理学特征 感染后 3 个月, 对 8 只静脉感染

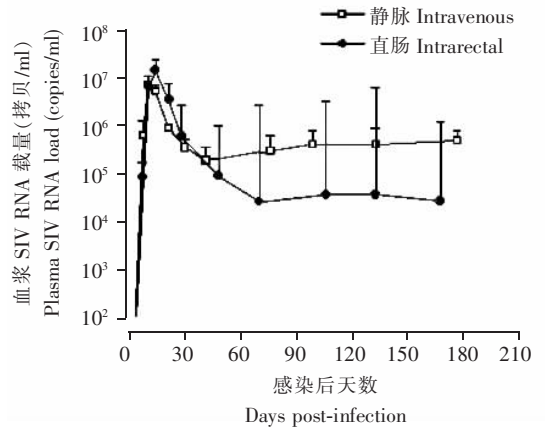


图2 SIVmac239 经静脉及直肠感染后血浆病毒载量

Fig 2 Plasma viral load after intravenous and intrarectal SIVmac239 infection

猴进行腹股沟淋巴结活检。结果显示: 淋巴组织呈增生和退变的过程; 淋巴滤泡普遍增大, 生发中心扩大, 但同时出现生发中心的淋巴细胞和中心淋巴母细胞退变。滤泡套层淋巴细胞明显减少, 副皮质变薄, 个别皮质内淋巴滤泡消失。快速进展型猴 M329 的淋巴组织退变更为显著 (图 4)。直肠感染猴在 4.5 个月时淋巴结活检, 淋巴结病变呈退变, 滤泡生发中心变小, 有些滤泡消失, 生发中心明显退变。生发中心细胞凋亡较多。

对快速死亡的 3 只猴进行尸检, 发现 M329 猴全身淋巴结的淋巴组织耗竭 (图 3); M332 为淋巴组织耗竭合并卡氏肺囊虫肺炎而死亡; M330 死于淋巴组织耗竭合并肺炎而死亡。显示其艾滋病已进入晚期, 淋巴组织耗竭, 免疫功能严重缺陷, 导致机遇

感染并死亡。

讨 论

SIV 感染的恒河猴作为人类 HIV 感染及艾滋病的动物模型, 广泛应用于艾滋病免疫学、病毒学、发病机制以及疫苗、药物的研究中。国际上较广泛采用的是印度恒河猴, 但存在一定不足: (1) 与 HIV 感染相比较, 印度猴模型发展成为 AIDS 的进程要迅速; (2) 血浆病毒载量比 HIV 感染者的血浆病毒载量高 1 000 倍; (3) 抗体反应弱; (4) 印度来源的猴较为短缺。因此, 近年国际学界尝试采用中国恒河猴作为艾滋病模型, 并发现与印度恒河猴相比较, 中国恒河猴与人类 HIV 感染的进程更为相近^[1,2]。

本研究比较了 SIVmac239 和 SIVmac251 的不同特性^[4], 并使用 SIVmac251 建立了慢性感染的中国恒河猴模型^[5]。SIVmac251 为非克隆株, 个体间差异较大, 给实验研究带来一定的不便。本研究采用 SIVmac239 建立中国恒河猴的静脉感染及直肠感染的模型, 并初步比较了不同感染途径在病毒学、免疫学等指标上的差异, 为进一步应用提供了依据。

本研究 19 例静脉感染猴及 6 例直肠感染猴均出现淋巴结肿大, 并在感染后 4 周左右出现抗体阳转。在感染后 10 ~ 14 d, 经静脉或直肠感染的恒河猴血浆病毒载量均达到高峰, 然后迅速下降, 并从 41 ~ 76 d 开始维持于平台期 (set point), 绝大多数在 $10^3 \sim 10^6$ copies/ml (与 HIV 感染后近似^[1])。经静脉感染后, CD4 + T 细胞下降较为明显而均一, 有 2 只静脉感染猴及 1 只直肠感染猴在感染后 5 ~ 7 个月死于免疫缺陷和机遇感染, 呈现与快速进展型 HIV-1 感染者相似的特征。以上特点表明, SIVmac239 经静脉和直肠途径均可感染中国恒河猴并建立慢性感染, 与人类 HIV 感染急性期至中期的进程及表现极为相似, 是

理想的动物模型。

本研究显示静脉和直肠感染达到峰值及平台期的时间、平台期的病毒载量差异均无显著性; 直肠感染后半年内 CD4 + T 细胞数下降不明显, 且存在较大的波动和个体差异。这种差异的产生可能由于黏膜屏障的保护以及选择作用, 以及黏膜免疫系统可能在局部发挥抗病毒免疫作用^[6]。由于性传播是 HIV 的主要传播方式之一, 进一步深入黏膜感染及黏膜免疫的研究, 对于理解 AIDS 的发病机制、研发疫苗均有重要的意义。

(志谢: 感谢孙利华、袁菊、鲍琳琳在动物实验及病毒载量测定方面协助进行的大量的实验工作)

(本文图 3, 4 见插图第 1 页)

参 考 文 献

- [1] Ling B, Veazey RS, Luckay A, *et al.* SIVmac pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans [J]. *AIDS*, 2002, 16(11):1489-1496.
- [2] Burdo TH, Marcondes MC, Lanigan CM, *et al.* Susceptibility of Chinese rhesus monkeys to SIV infection [J]. *AIDS*, 2005, 19(15):1704-1706.
- [3] Lu W, Wu X, Lu Y, *et al.* Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS [J]. *Nat Med*, 2003, 9(1):27-32.
- [4] 吴小闲, 张奉学, 何伏秋, 等. 猴免疫缺陷病毒 (SIV) 慢性感染猴模型的建立 [J]. *广州中医药大学学报*, 2000, 17(4):355-357.
- [5] 吴小闲, 卢耀增, 魏 强, 等. 两株 SIVmac 的滴定和特性 [J]. *中国实验动物学报*, 1998, 6(2):18-21.
- [6] Miller CJ, Li Q, Abel K, *et al.* Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus [J]. *J Virol*, 2005, 79(14):9217-9227.

(2007-06-08 收稿)