

## 中国猕猴逆转录病毒的分离

张新生 倪燕萍 伍治平 许健 陈德蕙 舒子正

(成都军区军事医学研究所、成都军区病毒研究所, 昆明 650032)

Nicholas W. Lerche

(美国加州灵长类研究中心, 美国)

Lerche, NW ✓

R 512.910.3

## 提 要

国内首次从捕自中国三个地区的猕猴分离到三株逆转录病毒, 经 ELISA、免疫荧光检查与 SRV-1 呈阳性反应。免疫蛋白印迹试验加以证实, 血清抗体与 SRV-1 呈阳性反应, 其中有一株与 SRV-1 和 STLV 血清抗体有交叉反应。电子显微镜下见有大量病毒颗粒, 具有典型逆转录病毒结构。

关键词: 逆转录病毒 猴艾滋病

猴逆转录病毒引起的猴获得性免疫缺陷综合症 (Simian acquired immunodeficiency Syndrome, 简称 SAIDS) 即猴艾滋病, 是一种外源性逆转录病毒引起的猴传染病, 严重危害猴群健康。由于猴艾滋病与人艾滋病的临床表现相似, 以猴作为艾滋病模型进行该病发病机理、药物实验和疫苗研究, 受到各国学者的广泛重视。我们自 1988 年以来, 在开展猴艾滋病模型研究的同时, 对我国猕猴进行了猴艾滋病有关病毒的研究, 首先在国内从中国猕猴中分离到逆转录病毒。现将结果报告于下:

## 材 料 和 方 法

一、SRV-1 猴 D 型逆转录病毒, 抗 SRV-1 猴血清及分离病毒 Raji 细胞系: 由美国加利福尼亚州灵长类研究中心 Marx 博士赠送。

二、病毒分离<sup>[1]</sup>: 猴外周血, 用 Ficoll-Hypaque 密度梯度分离其外周血单核细胞, 配成  $5 \times 10^5$  细胞/ml, 与配制好的 Raji 细胞 ( $2 \times 10^5$  细胞/ml) 用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 于 CO<sub>2</sub> 孵箱中共同培养 2—3 周, 挑选出现融合细胞的样品, 做免疫荧光和电镜检查。

三、间接免疫荧光检查病毒: 将待检查细胞冷冻后, 加 10% 正常羊血清, 37℃ 水浴 30 分钟, 涂片, 丙酮固定三次, 加 SRV-1 的 gp-20 单抗 (美国加州灵长类研究中心 Marx 博士赠送), 37℃ 孵育 30 分钟, 加羊抗鼠 IgG 荧光结合物 37℃ 孵育 30 分钟, 荧光显微镜检查。

四、抗体测定: 分离到病毒的猴血清, 使用经蔗糖梯度纯化的 SRV-1 抗原, 按常规作 ELISA 和免疫荧光 (IFA) 检查<sup>[1]</sup>。

1991年5月15日收到, 7月24日修回

感谢中国医学科学院医学实验动物研究所对此项工作技术和材料上的指导和帮助

五、电子显微镜观察: 分离病毒出现融合的 Raji 细胞, 经1500r/m离心10分钟, 沉淀经2.5%戊二醛预固定2小时, 丙酮系列脱水, Epon812包埋, 剑桥—卫永超薄切片机切片, 醋酸铀-柠檬酸铅双染色, 日立H-600-2电子显微镜观察。

六、免疫蛋白印迹试验 (Western Blot): 分离到病毒的猴血清送美国加州灵长类研究中心, 按文献<sup>[3]</sup>, 用 SRV-1, STLV 及 SIV 做免疫蛋白印迹试验。

## 结 果

从中国西南三个地区捕获三批野生猴, 三批猴分笼饲养。野生猴送抵实验室的第二天抽血取样。从每批各一只幼猴 (分别为6月龄, 1月龄和2月龄) 中分离到三株病毒 (分别命名为 CYK-1、CGK-1、CCK-1)。

与上述分离到 CYK-1 病毒的6月龄幼猴同批送达的, 还有另外三只幼猴, 在送抵实验室第二天抽血, 从这三只猴未分离到病毒。但经与6月龄猴同笼饲养后, 其中两只分别第46天和第96天分离到病毒 (CYK-2, CYK-3)。剩余一只一直未分离到病毒, 但5个月, 测到抗体阳性。

电镜超薄切片观察, 在出现融合的 Raji 培养细胞间隙, 可见到大量游离病毒分布于细胞周围, 病毒颗粒呈圆形或椭圆形, 直径100—130nm, 病毒中心有一个电子密度差异较大的核心, 有的病毒颗粒核心外边有一层高电子密度膜。病毒核心由于切片位置差异呈不同的形态 (图1—3), 与国外文献<sup>[3]</sup>报道的猴D型逆转录病毒形态结构相一致。

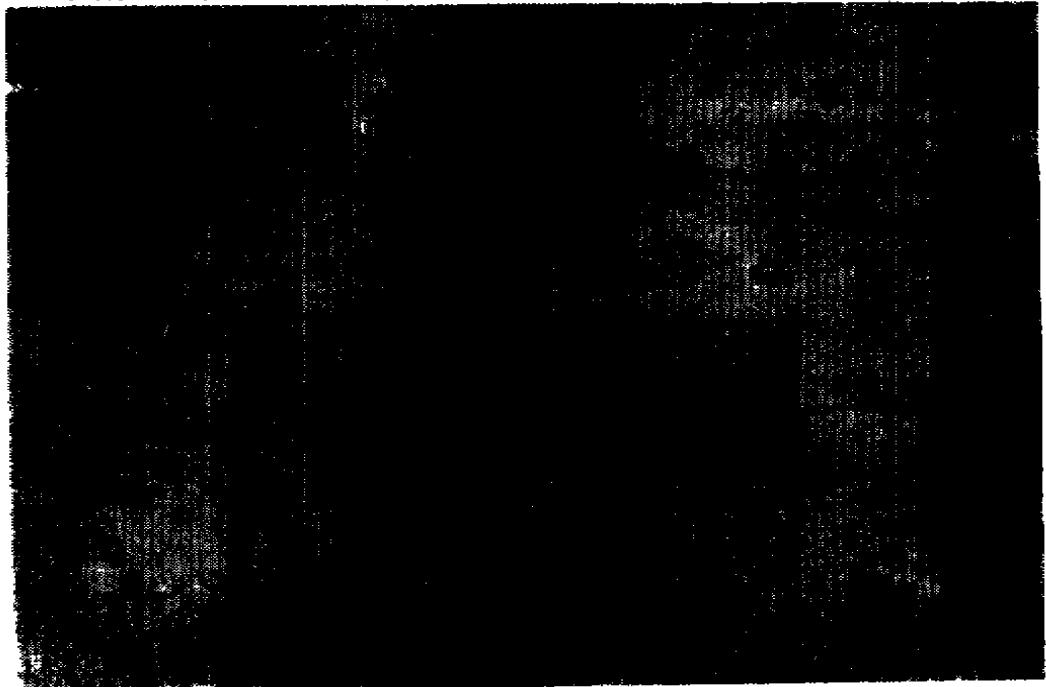


图 1. 分离病毒时出现的融合细胞, A: CYK-1 出现的大融合细胞。  
B: CGK-1 出现的小融合细胞。

Fig 1. Fusion cell occurred during the isolation of virus  
A. Big fusion cell appeared in CYK-1  
B. Small fusion cell appeared in CGK-1

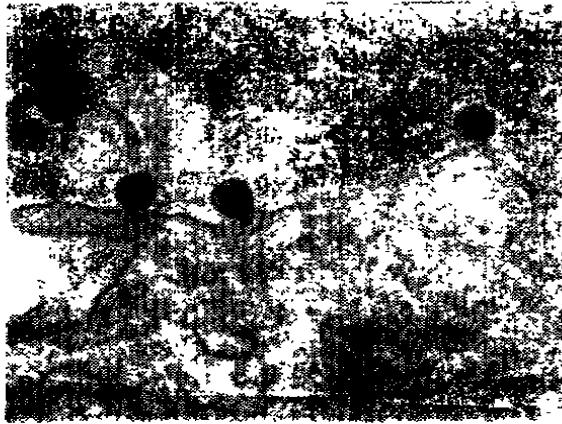


图2. 病毒从细胞表面以出芽方式向外释放, 100000x

Fig 2. Release of virus from surface of cell 100000X

CYK-1病毒分离猴, 在捕至实验室34天时, 尚能分离到病毒, 抗体检测ELISA、IFA均为阴性。86天时, 因腹泻致死, 尸检发现有严重肝囊虫病变。CGK-1, CCK-1病毒分离猴, 分离到病毒时, ELISA和IFA抗体检测均为阳性。

将上述分离到病毒的中国猕猴血清抗体在美国加州灵长类研究中心进行试验, 结果<sup>[1]</sup>ELISA与国内结果一致。免疫蛋白印迹试验证实, CYK-2、CYK-3猴血清与SRV-1病毒反应阳性。CGK-1与SRV-1的p24、p31、p27

分离病毒时, CGK-1病毒引起Raji细胞融合与其他二株病毒有差异, CGK-1形成的融合细胞较小。

使用SRV-1的单抗gp-20(1:100稀释)做抗原免疫荧光检测, 出现融合的Raji细胞呈阳性反应。待融合细胞消失以后, 荧光更强。

使用纯化的SRV-1病毒<sup>[4]</sup>做酶联免疫吸附实验(ELISA)和免疫荧光(IFA)检测抗体,

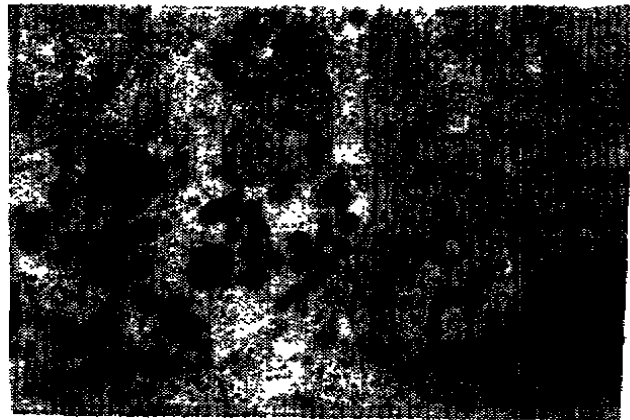


图3 培养细胞间隙大量病毒颗粒, 40000x

Fig 3. Large amount of virus particles in interspace of cultured cell

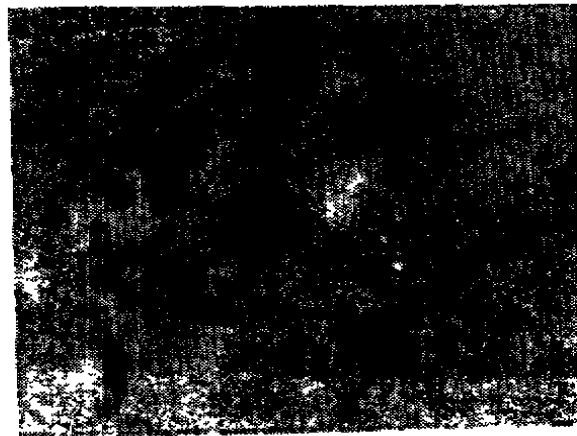


图4 坏死细胞内大量病毒颗粒, 25000x.

Fig 4. Large amount of virus particles in necrosis cell 25000X

带反应很弱。CGK-1猴血清与SPV-1的p27带反应阳性同时与STLV反应阴性。全部血清与SIV反应均为阴性。

## 讨 论

目前认为, 与猴获得性免疫缺陷综合症有关的病毒主要有三组: (1)STLV (Simian T-Cell Lymphotropic Virus); (2)SIV (Simian Immunodeficiency Virus); (3)SRV (Simian Retrovirus)。STLV病毒属于猴白血病病毒 (Oncorna Virus)<sup>[1]</sup>, 与人HTLV-1 (Human T-cell Lymphotropic Virus)相类似。SIV属于慢病毒 (Lentiviruses), 与人HIV (Human Immunodeficiency Virus)相近<sup>[7,8]</sup>, 它与HIV-2在病毒蛋白的N-末端有90%氨基酸顺序等同<sup>[9]</sup>, 自1986年发现以来, 作为人艾滋病毒模型的研究受到普遍关注。SRV也称猴D型逆转录病毒。1969—1982年, 美国加州灵长类中心发生四次SAIDS流行, 致使大批猴群死亡, 病毒分离以后证实是由SRV-1引起<sup>[10,11]</sup>。SRV与一种最早从恒河猴自发性乳腺癌分离的病毒Mason-Pfizer猴病毒 (MPMV)很相象<sup>[11]</sup>, 但致病性有区别。SRV-1实验接种猕猴以后, 产生免疫抑制病, 并导致死亡与人艾滋病的症状有许多相似之处, 故在1986年以前, 也普遍称猴艾滋病D型逆转录病毒<sup>[1,10]</sup>。美国几个灵长类研究中心所爆发SAIDS的猴中所分离到的主要是SRV病毒, 因此, 一般认为SRV是SAIDS的主要病原<sup>[12,17]</sup>。

我国从事灵长类研究的人员根据一些猕猴患有坏死性龈炎及其它临床表现, 曾怀疑我国猕猴中有SRV类病毒。美国俄勒岗灵长类研究中心从中国出口的猕猴中分离到特殊血清型猴艾滋病病毒, 分型为SRV-5。在美国俄勒岗灵长类研究中心已经做过SRV-5的病毒接种试验, 被接种的动物均产生类似SAIDS综合症状<sup>[17]</sup>。1988年, 我们开展猴艾滋病模型研究<sup>[18]</sup>以后, 曾用ELISA和IFA方法查到我国猕猴群中带SRV抗体<sup>[14]</sup>。

根据我们实验感染SRV-1猴分离病毒的规律<sup>[14]</sup>, 一般至少在感染15天后才能分离到病毒。我们所捕获的三批猴是隔离饲养, 而且是在野生猴运抵实验室的第二天取样, 因而, 我们所分离到的病毒不可能是实验室感染的。Western Blot实验证明, CYK-1猴与同笼饲养的CYK-2、CYK-3猴抗体一致, 说明该病毒具有感染性。CGK-1猴抗体有三条带与SRV-1和STLV呈阳性反应进一步排除了实验室感染的可能性, 证明我国猕猴确有SAIDS病, 在国内提供了病原学证据。这几株病毒中, CGK-1、CCK-1分别在SRV中的型别, 尚需进一步深入做分型工作。

人类艾滋病已成为世界瘟疫, 1990年10月, 我国公布在云南境内发现364例艾滋病病毒感染者, 我国正加紧AIDS的研究。与人AIDS相比, SAIDS虽有一定的差异, 但表现更严重和急性, 病毒破坏宿主免疫细胞种类比人AIDS多<sup>[12,14]</sup>。我们分离到的猴逆转录病毒的感染致病性、生物学特性等尚待深入进行研究。

## 参 考 文 献

- [1] Daniel M.D et al., 1984, *Science* 223: 602.  
 [2] Munn R. J et al., 1985, *Lab Invest* 53(2): 194.  
 [3] Burnetth W.N., 1981, *Anal Biochem* 112: 159.  
 [4] Kwang H.S et al., 1987, *Lab Invest* 56(6): 591.  
 [5] Lerche N.W., 1990.1.30 个人通信。  
 [6] Tsujimoto H et al., 1985, *Int J Cancer* 15: 35(3): 377.  
 [7] Arya S.K et al., 1987, *Nature* 328(6): 548.  
 [8] Franchini G et al., 1987, *Nature* 328(6): 539.  
 [9] Benvaniste R. E. et al., 1985, *J Viro* 56(2): 571.  
 [10] Marx P A et al., 1985, *J Viro* 56(2): 571.  
 [11] Chopra H.C et al., 1970, *Cancer Res* 30: 2081.  
 [12] Gardner M.B et al., 1985, *Adv Virol. Oncol* 5: 57.  
 [13] 吴小闲等, 1988, 中国医学科学院学报 10(4): 305.  
 [14] 中国猕猴D型逆转录病毒体调查(待发表)。  
 [15] 吴小闲等, 1989, 猴艾滋病模型的建立、中国第二届全国实验动物学会年论文集, 昆明。  
 [16] King N.W., 1986, *Vet Pathol* 23: 345.  
 [17] 田保平等, 1989, 动物学研究 10(增刊): 161.

### Three Isolates of Retrovirus from Chinese Rhesus Monkeys

Zhang Xin-sheng Ni Yan-ping Wu Zhi-ping Xu Jian

Chen De-hui Shu Zi-zheng

(Military Medical Institute of Chengdu Military Area, Virology Research  
Institute of Chengdu Military Area, Kunming 650032)

Nicholas, W. Lerche

(California Primate Research Center, U.S A.)

Three strains of retrovirus, which can give positive results both by ELISA and immunofluorescence assay (IFA) with SRV-1 newly have been isolated from Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) caught from three areas of China. It have been confirmed by Western Blot that their seroantibodies response with SRV-1 positively. One of them occurs cross-response with of SRV-1 and STLV.

Lots of the virus particles having typical ultrastructures of retrovirus have been observed by electron microscope.

**Key words,** Retrovirus AIDS Virus