研究报告

恒河猴艾滋病模型中枢神经系统及淋巴结病变的电镜观察

徐艳峰[1],孙丽华[1],潘菊华[2],卢耀增[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. 中国中医科学院,广安门医院,北京　100053)

【摘要】　目的　观察恒河猴艾滋病模型不同感染阶段中枢神经系统及淋巴结的超微结构改变,探讨艾滋病的发病机制和病理改变的发展过程。**方法**　15 只恒河猴,1 只为正常对照,其余 14 只静脉注射感染 SIVmac239 猴艾滋病病毒,分别于感染后 1 周,2 周,1 个月,2 个月,12 个月,18 个月取腹股沟淋巴结及下丘脑组织进行透射电镜检查。**结果**　感染后 1 周即可出现淋巴结内淋巴细胞病变,表现为线粒体肿胀,嵴溶解,出现自噬体等。感染后 2 周及 1 个月时淋巴细胞病变主要表现为线粒体肿胀,嵴溶解;感染 2 个月时淋巴细胞细胞核形态出现明显改变。感染后 12 个月淋巴结内多数淋巴细胞出现病变,细胞肿胀,细胞器正常形态大部分消失;部分细胞出现溶解性坏死的特征。至感染后期(18 个月时),淋巴结内局部淋巴细胞稀疏,细胞核肿胀或形态不规则。中枢神经系统的病变在感染后 1 周出现,表现为神经纤维肿胀,感染后 2 周出现神经元的病变,表现为神经元线粒体肿胀,粗面内质网脱颗粒,尼氏体消失;神经纤维内出现空泡。感染后 12 个月及 18 个月时,神经元和神经纤维的病变加重。**结论**　在 SIV 感染早期,淋巴结内淋巴细胞及中枢神经系统即可出现病变,维持一段相对稳定的时间后,至疾病后期,病变加重。中枢神经系统与淋巴结的超微结构病变发展规律有一定的相似性。

【关键词】　SIV;艾滋病动物模型;电镜;恒河猴;中枢神经系统;淋巴结

【中图分类号】R332　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2012)06-0005-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.06.002

TEM Evaluation of Central Nervous System and Lymph Node Lesions in SIU-infected Rhesus Monkey

XU Yan-feng[1], SUN Li-hua[1], PAN Ju-hua[2], LU Yao-zeng[1]

(1. Institute of Laboratory Animal Sciences; Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine Beijing 100021, China; 2. Guang'anmen Hospital, Academy of Chinese medical sciences, Beijing 100053, China)

【Abstract】　Objective　To observe ultrastructural changes of central nerve system and lymph nodes at different stages of SIV infection in rhesus monkeys, explore the pathogenesis of simian AIDS. **Methods**　15 rhesus monkeys, 1 was used as normal control, the other 14 monkeys were infected with SIVmac239 intravenously. Inguinal lymph nodes and hypothalamic tissues were inspected by transmission electron microscopy at 1 week, 2 weeks, 1 month, 2 months, 12 months and 18 months after infection. **Results**　1 week after infection, lymphocytes in lymph node showed pathological changes, manifested as mitochondria swelling with cristae dissolution and autophagies. At time points of 2 weeks and 1

[基金项目]国家科技重大专项(2008ZX10005 - 004)。

[作者简介]徐艳峰,助理研究员,研究方向:毒性病理学。

[通讯作者]徐艳峰,Email:xuyanf2009@163.com。

month after infection, lymphocytes showed mitochondria swelling with cristae dissolution. 2 months after infection, the nuclei of the lymphocytes were obviously deformed. At 12 months after infection, a high proportion of lymphocytes had obvious lesions, manifested as cell swelling, most organelles lost their normal appearance; some cells showed features of solubilized necrosis. At 18 months after infection, the lymphocytes were sparse in some areas of the lymph node, the nuclei of the lymphocytes were swelling or had irregular shapes. Central nervous system lesions appeared at 1 week after infection, manifested as nerve fiber swelling. At 2 weeks after infection, the neuron showed mitochondria swelling, rough endoplasmic reticulum degranulation, Nissl bodies disappearing; there were vacuoles in the nerve fibers. At 12 months and 18 months after infection, the lesions of neurons and nerve fibers were increased. **Conclusions** In the early stage of SIV infection, the lesions can be found in lymph node and central nervous system. After maintaining a relatively stable stage, the disease deteriorated, the lesions were increased. The lesions in the central nervous system and lymph node showed some similarity in the development.

【Key words】 SIV; AIDS animal model; Electron microscopy; Rhesus monkey; Central nervous system; Lymph node

在 HIV 感染的早期,HIV 病毒即在淋巴结的 CD4 + T 淋巴细胞内复制,导致病毒血症和 CD4 + T 淋巴细胞减少,引起细胞免疫缺陷。随着病情进展,淋巴结结构逐渐破坏,并出现其他一系列病变,包括神经系统的病变。HIV 感染的患者中,25% 会发生 HIV 脑病。HIV 感染也与多种神经病相关,包括远端感觉性神经病、多发性单神经炎、炎症性脱髓鞘性多发性神经病以及进行性多发性神经根病变[1,2]。HIV 脑病及神经病变的发病机制尚不明确。

SIVmac 病毒能在恒河猴引发与人类 AIDS 类似免疫缺陷综合症,出现 CD4 淋巴细胞下降、机会性感染、病毒性脑炎,因此常以此病毒感染恒河猴作为研究人类 AIDS 的重要动物模型[3-6]。本文以 SIVmac239 静脉感染恒河猴,在感染各时期采取动物下丘脑组织和淋巴结进行电镜检查,在亚细胞水平观察 SIV 在中枢神经系统和淋巴结引起的病变及其发生发展的规律,并为艾滋病治疗时机的选择提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

中国恒河猴,成年(7 ~ 11 岁),雌雄各半,共 15 只,体重 4.76 ~ 8.76 kg。购自北京协尔鑫生物资源研究所(Institute of Beijing XIEERXIN Biology Resource),SCXK(京)2005 - 0005。试验前经检查无 SIV、逆转录病毒 D 型(SRV)和猴 T 淋巴细胞病毒 1 型(STLV - 1)抗体,饲养在生物安全环境下,用于实验。实验在中国医学科学院医学实验动物研究所 ABSL - 3 实验室内进行(资格证号:卫 BSL3 - 006)。

1.2 病毒来源和标本采集

SIVmac239 猴艾滋病病毒,美国 Aaron Diamond 艾滋病研究所 P. A. Marx 教授赠送,经用中国恒河猴 PBMC 体外扩增的病毒液,滴度 $1 \times 10^8 TCID_{50}/L$,用 1:50 稀释 1mL($2000TCID_{50}$)静脉注射上述 14 只中国恒河猴,1 只留作正常对照。采集 EDTA 抗凝血,分离血浆,采用 Real - time PCR TaqMan 探针法测定病毒载量。各动物的病毒载量均在感染后 10 ~ 14 d 达到高峰(> 10^6 拷贝/mL)。感染动物分不同时间点安乐死,采取腹股沟淋巴结及下丘脑组织在北京大学第一医院电镜室用透射电镜(型号:JEM - 1230)检查。采样时间为:感染后 1 周,2 周,1 月,2 月各 2 只动物,感染后 12 周 4 只动物,感染后 18 周 2 只动物。

2 结果

2.1 对照组淋巴结内淋巴细胞的超微结构

对照组动物淋巴结内可见小淋巴细胞及大淋巴细胞,小淋巴细胞呈较规则圆形,核浆比例大,异染色质明显,团块状,沿核膜内侧分布,可见少量粗面内质网及线粒体,结构清晰,无异常改变。大淋巴细胞圆形或椭圆形,偶见微绒毛状突起,核浆比例稍小,异染色质少,呈小块状。粗面内质网及线粒体多见,结构清晰,无异常改变。

2.2 实验组淋巴结内淋巴细胞的超微结构改变

感染后 1 周大淋巴细胞出现线粒体自噬,少数线粒体肿胀,嵴溶解,核基质灶性稀疏。感染后 2 周淋巴细胞线粒体肿胀,可见自噬体。感染后 1 个月淋巴细胞多数线粒体肿胀,嵴溶解,核膜双层间隙加大;可见临近死亡的淋巴细胞,表现为细胞核结构消失,有多量溶酶体。感染后 2 个月淋巴细胞胞

浆内线粒体肿胀,高尔基体扩张,溶酶体增多;细胞核形态明显不规则,可见染色质周围颗粒。感染后 12 个月淋巴结内多数淋巴细胞出现病变。部分表现为淋巴细胞内的细胞器溶解消失,胞浆基质灶性空化;核肿胀变圆,染色质稀疏,异染色质几近消失;部分细胞出现溶解性坏死;部分细胞内的线粒体肿胀,嵴溶解,内质网扩张。感染 18 个月后,淋巴结内局部淋巴细胞稀疏,细胞核肿胀或形态不规则(彩插 1 图 1)。

2.3　对照组下丘脑组织的超微结构

对照组动物下丘脑组织神经纤维结构清晰,髓鞘完整,无增厚及裂隙。神经元内细胞器及细胞核无异常改变。

2.4　实验组下丘脑组织的超微结构改变

感染后 1 周下丘脑神经纤维肿胀。感染后 2 周神经元线粒体肿胀,粗面内质网脱颗粒,尼氏体消失。下丘脑神经纤维内出现空泡。感染后 1 个月下丘脑神经纤维髓鞘增粗,分层,神经纤维肿胀。感染后 2 个月神经髓鞘增粗,神经纤维肿胀。感染后 12 个月神经元细胞核肿胀变圆,基质几近消失,残存细胞器明显肿胀,线粒体肿胀发空,内质网扩张,可见大量次级溶酶体。神经胶质细胞核核膜不完整;胞浆基质高度疏松空亮,只有少数细胞器,线粒体高度肿胀空化,嵴溶解消失。神经髓鞘不规则分裂,部分神经纤维髓鞘脱失,神经束疏松,可见空泡。感染后 18 个月下丘脑神经元胞浆内可见较多溶酶体,线粒体肿胀,嵴溶解,尼氏体消失。核膜不清晰,常染色质减少,有少量异染色质;部分神经髓鞘内神经纤维消失(彩插 2 图 2)。

3　讨论

HIV 感染的病人常在 HIV 感染后第 1 周出现淋巴细胞和血小板减少。淋巴结是 HIV 复制的重要部位,感染初期,在引流区淋巴结均能检测到病毒 DNA 和 RNA。经过急性期后,患者进入长短不一的相对稳定期。随着免疫系统的衰竭,患者进入艾滋病期,出现继发性感染和肿瘤等多系统病变[7]。本项研究中淋巴结病变的发展规律与 HIV 患者的病变过程类似。SIV 感染恒河猴后 1 周即可出现淋巴结内淋巴细胞的细胞器病变。在感染后较长时间内,淋巴细胞病变的表现维持相对稳定。至感染后期(感染 12 个月 ~18 个月时),淋巴结病变明显恶化。淋巴细胞病变明显,细胞器结构破坏,细胞核亦出现明显病变,肿胀变圆,染色质溶解。本研究报道了恒河猴艾滋病模型淋巴结的超微结构改变从 1 周到 18 个月的发展过程,结果提示,淋巴结病变在感染早期即可出现,且此时病变发展最快,而淋巴结中的 CD4 + T 淋巴细胞是病毒复制的主要部位,如果在感染早期即以药物治疗阻断病毒的复制,将更为有效地抑制病变的发展。疾病发展至后期,淋巴细胞出现死亡,细胞数量减少。死亡的细胞主要表现为细胞器的肿胀,可能与病毒蛋白或细胞因子导致膜结构的破坏有关。

HIV 急性感染也可以表现为 HIV 脑病,感染早期即可从中枢神经系统中分离到病毒。SIV 感染恒河猴后,也可引起中枢神经系统的病变。感染的细胞主要是巨噬细胞和小胶质细胞,其他被感染的脑细胞包括星型胶质细胞、少突细胞、毛细血管上皮细胞,也可能还有神经元。艾滋病脑炎的组织学表现为小胶质细胞结节,多核巨细胞,白质变性, 胶质细胞增生[8]。本研究中通过对下丘脑组织的电镜检查发现,神经系统的病变可在感染后 1 周出现,表现为神经纤维肿胀,感染后 2 周出现神经元的病变,表现为神经元线粒体肿胀,粗面内质网脱颗粒,尼氏体消失;神经纤维内出现空泡。感染后 12 个月及 18 个月时,神经细胞和神经纤维、髓鞘的病变明显加重。与艾滋病脑病变有关的机制包括多种因素,如免疫抑制,单核细胞/巨噬细胞聚集和激活,可溶性细胞因子的毒性,毒性细胞产物的聚集等,自身免疫也参与了中枢神经系统疾病的过程[9,10]。在 HIV 感染者中发现有周围神经自身抗体,这些抗体似是导致周围神经病理反应的原因。SIV 感染导致的恒河猴中枢神经系统病变,可能也是类似的机制所引起。本研究发现在疾病发展各阶段出现神经和髓鞘的病变。髓鞘的改变可能与 SIV 感染导致少突胶质细胞功能异常有关,尚需进一步研究证明。神经的变性可能与自身免疫、细胞代谢障碍多种因素有关。本实验中观察到在感染 2 周时出现神经元的病变,感染 12 个月及 18 个月时神经元病变明显加重。目前 HIV 在神经元内复制的证据尚不充分,本实验中也未在神经元内检测到明确的病毒颗粒,推测神经元的损伤可能与前述多种机制有关。本实验中,中枢神经系统与淋巴结的超微结构病变发展规律有一定的相似性。

参考文献:

[1] McArthur JC, Haughey N, Gartner S, et al. Human

immunodeficiency virus – associated dementia : An Evolving Disease[J]. J Neurovirol 2003; 9(2):205 – 221.

[2] Albright AV, Soldan SS, Gonzalez – Scarano F, et al. Pathogenesis of human immunodeficiency virus – induced neurological disease[J]. J NeuroVirol 2003;9(2):222 – 227.

[3] Williams R, Bokhari S, Silverstein P, et al. Nonhuman primate models of neuro AIDS[J]. J Neurovirol 2008; 14(4): 292 – 300.

[4] 卢耀增, 吴小闲, 李国桥等. 猴免疫缺陷病毒急性及慢性感染淋巴结的病理变化[J]. 广州中医药大学学报 2003;20(3):191 – 194.

[5] 卢耀增,吴小闲,涂新明等. 猴免疫缺陷病毒(SIV)猴模型的建立[J]. 中国实验动物学报 1994;2(2):94 – 101.

[6] 黄海,贲昆龙, 郑永唐. 人类艾滋病动物模型的研究现状[J]. 动物学研究 1997;18(1):121 – 128.

[7] Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease[J]. Nature 1993; 362(6418):355 – 358.

[8] Lackner AA, Smith MO, Munn RJ, et al. Localization of simian immunodeficiency virus in the central nervous system of rhesus monkeys[J]. Amer J Pathol 1991;139(3):609 – 621.

[9] Tan SV and Guiloff RJ. Hypothesis on the pathogenesis of vacuolar myelopathy, dementia, and peripheral neuropathy in AIDS[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1998; 65(1):23 – 28.

[10] Orandle MS, MacLean AG, Sasseville VG, et al. Enhanced expression of proinflammatory cytokines in the central nervous system is associated with neuroinvasion by simian immunodeficiency virus and the development of encephalitis [J]. J Virol 2002; 76(11): 5797 – 5802.

〔修回日期〕2012-03-05

(上接第 4 页)

本研究历时 18 个月,观察了动物口服给予受试物后不同时间点(2 周、4 周、6 周、8 周和 10 周)和恢复期不同时间点(恢复期 1 个月、恢复期 2 个月、恢复期 8 个月、恢复期 13 个月和恢复期 16 个月),系统进行了尿液、血液和 B 超的检测。观察到不同受试物(三聚氰胺、三聚氰胺和三聚氰酸、三聚氰胺和腺嘌呤)对动物肾脏损伤及转归的情况。因本研究使用的动物数量较少,没有定期进行肾脏组织的病理学检查,若将三聚氰胺等物质对非人灵长类动物的损伤外推到人类,还需要进行大样本、长时间的动物试验。

4 结论

4.1 单纯三聚氰胺(相当于人体使用量 48 mg/kg·w·d)不能造成恒河猴的肾脏功能的明显损害,可形成肾结石。

4.2 在三聚氰酸或腺嘌呤存在的情况下,三聚氰胺可以使恒河猴肾功能各项指标在正常范围内升高,并可在肾脏形成结石;经过较长时间的恢复后结石可以自行排出。

参考文献:

[1] Melamine and Cyanuric acid: Toxicity, Preliminary Risk Assessment and Guidance on Levels in Food[S]. 25 September 2008, WHO.

[2] The European Federation of Sea Anglers. EFSA's provisioned statement on a request from the European Commission on related to melamine and structurally related compounds such as cyanuric acid in protein-rich ingredients used for feed and food [EB/OL]. Parma:EFSA, 2007.

[3] Burns K., Recall shines spotlight on pet foods1 [J]. Am Vet Med Assoc 2007 230: 1285 – 1288.

[4] Roy L. et al. Identification and Characterization of Toxicity of Contaminants in Pet Food Leading to an Outbreak of Renal Toxicity in Cats and Dogs [J]. TOXICOLOGICAL SCIENCES 106(1), 251 – 262(2008).

[5] 国家食品药品监督管理局.《药物研究技术指导原则》(2005)[M]. 中国医药科技出版社 2006 年 8 月,94 – 102.

[6] 张秀明,温冬梅,袁勇.《临床生物化学检验质量管理与标准操作程序》[M]. 人民军医出版社,2010 年 1 月,252 – 275.

〔修回日期〕2012-04-20