

人体黏膜活组织模型在 HIV-1 性传播途径感染中的应用

杨瑜¹, 张晓燕^{1,2}

1 上海市公共卫生临床中心, 上海 201508

2 复旦大学生物医学研究院, 上海 201508

摘要: 性传播途径已经成为全球人免疫缺陷病毒 1 型 (Human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 传播的主要方式。对 HIV-1 黏膜感染机制的深入理解, 将有助于研发新型有效的生物技术阻断其感染和传播。目前, HIV-1 黏膜感染机制的研究主要依赖于体外细胞培养和灵长类动物模型。近年来, 一种新型黏膜活组织模型 (包括人体生殖道或肠道黏膜等组织) 的建立, 可再现 HIV-1 突破黏膜屏障进入基底侧的生物学过程, 适用于 HIV-1 黏膜感染机制与黏膜局部感染阻断生物技术的临床前有效性评价研究。以下主要阐述了该模型的组织类型、技术特点以及在 HIV-1 性途径感染机制与阻断技术研究中的进展, 并结合本实验室工作对其新的应用进行了展望。

关键词: 人免疫缺陷病毒 1 型, 性传播, 组织培养, 模型应用

Application of human mucosal explants culture in the HIV-1 sexual transmission

Yu Yang¹, and Xiaoyan Zhang^{1,2}

1 Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China

2 Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 201508, China

Abstract: Sexual transmission has become the major route of acquiring human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) globally. Understanding the mechanism of HIV-1 mucosal infection will be helpful for development of new effective strategies to block HIV-1 mucosal transmission. Currently, study of the mechanism of HIV-1 mucosal infection majorly depends on *in vitro* cell culture systems and non-human primate animal models. Recently, a novel tissue explant model (including human vaginal-genital and colorectal tissue) was established, which could elucidate the biological process of HIV-1 mucosal infection from crossing over the membrane to reaching the basal. Therefore, the model can be applied to the study of mechanism, as well as the safety and efficacy evaluation in pre-clinical study of biomedical prevention strategies. In this review, we summarized the recent progress about human mucosal explants model including the sources of tissues, technical characteristics and their application to study the mechanism of HIV-1 sexual transmission and evaluation of prevention strategies. Based on our recent study results, we also provided our opinions about

Received: June 3, 2010; **Accepted:** October 15, 2010

Supported by: Program of Shanghai Subject Chief Scientist (A type) (No. 10XD1403500), Scientific Research Priming Foundation of Shanghai Public Health Clinical Center (No. KSF0268).

Corresponding author: Xiaoyan Zhang. Tel: +86-20-37990333-7310; Fax: +86-20-57247094; E-mail: zhang_xycn2002@yahoo.com.cn
上海市优秀学科带头人计划 (A 类) (No. 10XD1403500), 上海市公共卫生临床中心科研启动基金 (No. KSF0268) 资助。

development of novel explant models and their application.

Keywords: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), sexual transmission, mucosal infection, explants culture model

在全世界范围内有将近一半的 HIV-1 感染者是妇女, 她们大多通过异性性接触而感染 HIV-1^[1]; 另一方面经同性性接触而感染 HIV-1 的男男同性恋人群 (Men who have sex with men, MSM) 的比例近年来也在迅速地增长^[2]; 总体来看, 经性接触传播已经成为全球 HIV-1 疫情难以控制的主要原因。我国 HIV-1 新发感染上升的趋势依然难以遏制。2007 年新发感染者中 56.9% 为经性途径感染, 2009 年已经上升为 70%, 性传播已成为我国 HIV-1 感染与传播的主要途径, 促使 HIV-1 从高危人群向一般人群扩散^[3]。

黏膜感染 HIV-1 过程中包括生殖道途径和直肠途径, 研究表明病毒从生殖道部位侵袭到建立系统感染一般需要 3~4 d 的时间^[4]。而相关的病毒侵入与感染黏膜的机制都存在很多不明之处: 例如 HIV-1 病毒是以游离病毒还是以细胞内病毒的形式感染宿主黏膜细胞? 病毒是如何穿越宿主的黏膜屏障进入黏膜下组织? 病毒在黏膜感染的初始靶细胞是什么? HIV-1 进入黏膜后, 黏膜的早期免疫反应是抑制病毒还是给病毒更多机会增殖? 从 HIV-1 进入生殖道或直肠到建立系统的全身感染, 有哪些宿主的细胞以及因子与之相互作用? 哪些时点和分子可以成为新的生物预防技术的靶点? 上述疑惑严重制约了有效的 HIV-1 黏膜生物预防技术包括疫苗和杀微生物剂的研究。

早期的感染机制研究, 多采用体外细胞培养和灵长类动物模型研究。感染 SHIV 嵌合病毒的非人灵长类动物模型可很好再现 HIV-1 宿主感染的生物学过程, 但是动物的购买费用昂贵且感染实验需在大动物生物安全三级实验室开展, 难以广泛应用。在细胞水平, 体外 HIV-1 感染多采用可永生传代的细胞系 (Caco2、Jurkat 细胞等), 与正常人体细胞有较大差异; 而人 PBMC 则需要外源激活剂 (PHA 等) 来维持 HIV-1 在其中的复制, 也明显改变了细胞表

面分子的标记, 加之细胞种类单一, 都不足以模拟正常黏膜中的靶细胞及其所处的微环境。因此, 有关 HIV-1 黏膜感染的机制研究, 以及对近年来应用于局部阻断或抑制 HIV-1 感染的杀微生物剂等预防手段的安全性和有效性评价一直缺乏经济有效的模型。

为深入探索 HIV-1 黏膜侵入与感染的机制, 研究人员近年来尝试建立了一种新型的人体活组织体外培养模型。其组织来源可来自女性生殖道或者男性生殖器组织、口腔黏膜以及结直肠黏膜组织。本文将就上述活组织体外培养模型的特点以及在 HIV-1 性传播途径感染研究中的应用加以综述。

1 活组织培养的起源

组织培养是指组织在体外条件下的存活或生长。动物组织培养的技术起源于 19 世纪所应用的若干胚胎学技术。1907 年美国胚胎学家 Harrison 的蛙胚神经管组织实验成为组织培养真正开始的标志^[5]。20 世纪 50 年代, 随着操作技术、培养器皿和培养基的改进, 组织培养技术得到更快的发展。

组织培养的培养物可以在组织上和功能上保持一定程度的分化, 这样就为实验生物学提供了既处于一定的组织结构之中又脱离了体内种种复杂因素的细胞群体。但在经典的组织培养技术中, 由于细胞常常从培养物中向外迁移, 因此培养物很快便失去了它们的组织分化特性。后来采用把组织放置在细胞难以粘附的表面上, 减少支持物与组织的接触面积, 以及把组织包埋于琼脂中等方法, 大大减少了细胞迁移现象, 从而达到限制生长, 使器官专一细胞同它们的基质细胞维持相对正常的结构关系的目的。

2 模型应用的组织类型与来源

HIV-1 黏膜感染主要涉及的组织类型有子宫颈阴道^[6]、包皮^[7]和直肠乙状结肠^[8]等。按组织的结构特点可分为单层柱状上皮类 (结直肠、子宫颈内膜等) 与复层鳞状上皮类 (阴道、子宫颈外膜、包皮等), 组织的不同结构特点决定了 HIV-1 进入机制的差异, 例如专属于单层柱状上皮细胞的胞转作用等。

子宫颈阴道组织多来自绝经期前妇女的子宫切除术后或阴道修补术后的标本^[9]; 子宫切除术常见于子宫多发性肌瘤, 而阴道修补术因属整形类手术, 受地域、经济因素影响大, 目前国内开展较少。

直肠乙状结肠组织有几种来源: 活检组织、肿瘤患者癌旁组织以及直肠脱垂患者组织。活检标本可通过内窥镜直视, 获取特异部位的黏膜组织, 但活检机械手臂咬合组织时容易伤及黏膜表面, 而且总量较少, 一个患者最多可获 20 块活检组织^[10], 相较而言肿瘤患者和直肠脱垂患者手术后获得的黏膜组织面积大, 可满足较多需求, 提高了实验设计的灵活性, 是目前较为常用的组织来源。

包皮组织绝大多数是因包皮过长进行的环切手术获得, 一般患者年龄偏低 (青少年), 极少合并其他重大疾病, 是上述各类组织来源中最接近体内正常组织生理状态的一种。

3 HIV-1 黏膜感染模型培养技术特点

活组织培养的方式, 有的是直接将组织标本块修剪, 进行培养, 其培养技术包括支撑筏 (Rafts)、Transwell 等^[10-11]; 也有的是用消散的细胞进行组织重建, 构成黏膜的片层, 再现上皮细胞的特征。

3.1 活组织整体培养

目前国际上有几家实验室相继开展了人体活组织培养在 HIV-1 感染中的应用研究。他们基于前人发展的组织培养技术, 结合 HIV-1 性途径感染特点, 研究建立 HIV-1 感染相关的黏膜组织模型。1992 年, Fleming 等为确认 HIV-1 能否直接感染人肠道黏膜而

不是肠道细胞系, 将胎儿肠黏膜剪切成块 (2 mm^3) 放入培养基进行了培养及感染实验, 这是较为早期的涉及黏膜体外培养进行 HIV-1 感染的尝试^[12]。

3.1.1 支撑筏模型 (Rafts)

Shattock 等将宫颈活检组织钻取成 3 mm 或 8 mm 直径大小, 黏膜面向上置于 24 板内的方形不锈钢网支架上, 加入培养基使其围绕支架形成新月形的气-液界面, 让黏膜表面暴露于空气, 而其底部则可透过不锈钢网格孔与培养基接触从而保证汲取营养。其后, 人们试用各种材质的支撑物对黏膜进行培养^[11], 如滤纸、Millipore 滤膜、吸收性明胶海绵等, 最终认为吸收性明胶海绵效果更有利于组织存活 (图 1A)^[10]。

3.1.2 Transwell 类模型

该类模型依据 Transwell 小室建立, 其外形为一个可放置在孔板里的小杯子, 并采用通透性滤膜作杯底。Collins 等^[13]的模型中, 将人宫颈复层鳞状上皮组织黏膜面向上放入上室滤膜, 用琼脂糖凝胶灌注封闭黏膜四周, 让病毒只能接触中心未封闭的黏膜表面 (图 1B)。Cummins 等^[14]发展的组织极化模型不同之处是将 Transwell 上室滤膜钻孔, 组织块从孔中穿越, 把黏膜层露在上室而基底部跨过滤膜浸入下室培养基中 (图 1C)。两种模型异曲同工, 都是只把黏膜面暴露于可接触病毒的环境, 近似的模拟生理状态下 HIV-1 在女性生殖道内感染的过程。但在实际操作中也暴露出一些问题, 如本实验室曾用该类模型, 发现在安全柜中操作时无法垂直注视小室, 向其中灌注凝胶时用量较难把握: 凝胶过多会将黏膜面一起封闭, 少则封闭不严发生病毒泄漏; 而 Shen 等^[15]的模型则逆向思维, 解决了这一问题 (图 1D): 他们将黏膜组织切成 1 cm^2 大小, 放入铺有尼龙滤网的上室中, 在黏膜面上放置一个直径 0.6 cm、高 1 cm 的聚丙烯小桶作为感染用“上室”, 然后用外科胶将小桶四周的黏膜面及暴露组织全部封闭, 这样可灌注足够量的凝胶而不必担心黏膜面被覆盖。在感染实验中相比两类方法可以看到, 前者的黏膜用

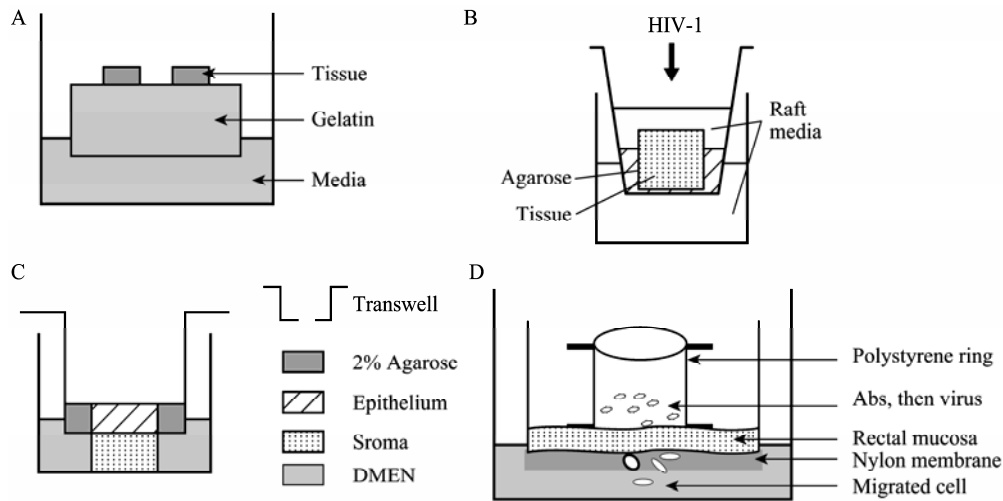


图 1 组织整体培养模型: Rafts 模型 (A)^[10]和 Transwell 模型 (B, C, D)^[13-15]

Fig. 1 The models of whole tissue culture: Rafts model (A) and Transwell models (B, C, D).

量较小,但对凝胶封闭操作技术要求高,且封闭后各实验孔间暴露的黏膜面积难以保持均一,这有可能导致不同实验孔的病毒因接触的黏膜面积及靶细胞的数量不同而对实验结果的统计产生影响;后者应用直径统一的聚丙烯小桶作为上室,保证了黏膜与病毒的接触面积相同,同时该做法使凝胶封闭也易于操作,不足之处是模型中每个实验孔对完整的组织黏膜用量都提高了近 2~3 倍,在一定程度上限制了实验规模。

3.2 活组织片层或细胞重建组织层培养

黏膜感染 HIV-1 后,上皮层内的粒细胞和郎格罕氏细胞 (Langerhans cells, LCs) 短时即可迁移出来,检测培养基中迁移细胞可以观察 HIV-1 的感染率,但活组织的整体培养无法确认细胞来源于上皮层还是基质层?因此,McElrath 教授的课题组采用一种体外器官活组织片层培养技术^[9],利用真空负压吸引或 EDTA 低温处理过夜的方法较为温和的分离上皮层与基质层,能保持上皮层的完整结构和活力。也有的采用消散的细胞或细胞系进行组织重建,构成黏膜的片层,再现上皮细胞的特征。如 Bouschbacher 等^[16]即利用人原代成纤维细胞和阴道上皮细胞共同重构阴道黏膜层,特异性观察整合进

去的 LCs 在 HIV-1 感染中的作用,避免了 T 细胞和巨噬细胞的“干扰”。Nazli 等^[17]将原代女性生殖道上皮细胞等建成紧密的单细胞层,以此验证 HIV-1 感染对黏膜屏障的损伤作用。此类模型虽然将组织微环境趋于简单化,与体内复杂环境有一定差异,却更有利于观察特定区域或特定细胞在 HIV-1 感染前后的变化。

4 在机制研究和生物预防技术评价中的应用

4.1 黏膜感染机制研究

HIV-1 侵入完整黏膜的途径包括:通过 LCs、树突状细胞 (Dendritic cells, DCs)、M 细胞 (Microfold cell) 等的捕捉式跨上皮运输方式^[18-19],或经与上皮细胞的半乳糖神经酰胺 (Galactosyl ceramide) 等受体结合被转运穿越上皮细胞层^[20]。穿越黏膜的病毒可直接感染固有层的 CD4+T 细胞,或与表达 DC-SIGN 受体的 DCs 结合,通过顺式感染或反式感染的方式进行传播:即一种方式是在 DCs 中建立感染进行复制,并利用产生的子代病毒感染 CD4+T 等靶细胞;另一种方式则以 DCs 为载体被直接运载去感染 CD4+T 细胞^[21]。

以上机制研究多采用动物或细胞模型。与这些

模型相比,组织模型的一个优势是可在 HIV-1 急性感染期进行多点连续采样进行免疫组化、流式细胞术、电镜等损伤性检测,对 HIV-1 进入黏膜的生物学轨迹进行跟踪研究,同时又不失其在体内复杂的组织结构。对于病毒进入的时间,采用人的宫颈阴道活组织培养体系观察 HIV-1 初始感染期的研究显示^[22],HIV-1 临床分离病毒株接种 3~4 d,在宫颈黏膜下层出现许多感染细胞,4~6 d 后在组织检测到感染的白细胞。而感染损伤的组织,则最早 3 d 即可检测到感染的白细胞。Gupta 小组的研究则进一步显示宫颈组织感染后 6 h 黏膜下层即可检测到 HIV-1 阳性细胞,并确认为记忆性 CD4+T 细胞;96 h 后 HIV-1 阳性 LCs 与巨噬细胞才被检测到^[23]。

在生殖道,通过活组织片层的感染研究发现,HIV-1 一旦接触局部黏膜可迅速渗透上皮内 LCs 和 CD4+T 细胞。HIV-1 进入 CD4+T 细胞几乎完全是由 CD4 和 CCR5 受体介导的直接融合方式,无需 LCs 细胞传递病毒。而 HIV-1 进入 CD1a+ LCs 细胞则主要通过细胞内吞 (Endocytosis) 作用,借助于多种受体^[9]。在 Saba 等的宫颈阴道组织模型研究中,感染的 T 细胞均为表达 CCR5 的效应记忆 T 细胞。尽管有广泛表达 CXCR4 受体,但绝大多数组织仍只支持 CCR5 嗜性 HIV-1 病毒的复制^[24],当单独阻断 CD4 或同时阻断 CXCR4 与 CCR5 受体时可局部抑制病毒的黏膜感染^[25]。此外,支持 CXCR4 嗜性病毒复制的组织拥有一个共同特征——富含 CD27+CD28+效应记忆 T 细胞^[24]。

进入黏膜后的病毒如欲进一步传播,离不开组织中细胞的迁移作用,同时阻断 CD4 与 DC-SIGN 可抑制迁移细胞对 HIV-1 的摄取与传播。流式分析与免疫染色迁移细胞时发现两群细胞:CD3+HLA-DR-和 CD3+HLA-DR+细胞,后者显著表达 DC-SIGN。研究显示这些 HLA-DR+细胞 90% 与 HIV 传播相关^[25]。

在对宫颈与包皮组织中免疫细胞进行比较研究时,Petterson 等^[26]发现成人包皮黏膜中 CD4+T 细胞、巨噬细胞、郎罕氏细胞的比例分别达 22.4%、

2.4% 和 11.5%,远高于儿童包皮组织 (4.9%、0.3%、6.2%) 和妇女的宫颈组织 (6.2%、1.4%、1.5%)。与宫颈黏膜或包皮的外表面组织相比,包皮内侧黏膜对 HIV-1 BaL (R5 嗜性) 有显著的易感性。此外,外源的刺激可改变组织中细胞表面蛋白的表达,TNF- α 处理可将静息 LCs 激活,这些都只发生在内侧包皮而非外侧包皮^[27],这部分解释了为什么包皮环切术可以降低人群中 HIV-1 的感染率^[28-29]。

近年来,由于 MSM 人群 HIV-1 感染显著上升,肠道黏膜在 HIV-1 传播与病理中扮演的作用日益受到重视。但是关于肠道黏膜 HIV-1 感染的机制缺乏深入的研究。生殖道黏膜与肠道黏膜的生理结构、组织细胞构成以及微生态环境均存在很大的差异性。例如同样的巨噬细胞在生殖道和肠道中对 HIV-1 感染易感性也存在很大的差异性。有报告称阴道和肠道的巨噬细胞表达不同水平的免疫受体及 HIV-1 受体 CD4 与辅助受体 CCR5、CXCR4。病毒穿越黏膜上皮后,是阴道而不是肠道巨噬细胞允许 R5 HIV-1 复制^[30]。HIV-1 肠道黏膜感染的机制包括首感细胞与迁徙轨迹则存在更多亟待探索的问题。

4.2 评价生物预防技术的安全性及有效性

评价杀微生物剂的安全性及有效性也是上述人体黏膜活组织模型最初建立的目的之一^[10,13]。由于第一个进入临床试验的抗 HIV-1 广谱杀微生物剂——壬苯醇醚 (Nonoxynol-9, N-9),没有显示出预期的保护效果,通过兔子阴道模型人们发现,临床剂量的 N-9 对黏膜有较大的毒性损伤,破坏上皮屏障,诱导炎症产生,从而导致 HIV-1 感染率不降反升^[31]。因此在用组织模型进行杀微生物剂评价之初,常用 N-9 作为对照,以观测黏膜对药物毒性的灵敏度。由于阴道与肠道组织的差异性,阴道用杀微生物剂能否安全有效的用于肠道需要重新进行评估。在 Fletcher 等^[10]的结直肠模型中,评价的 6 种杀微生物剂在 1 mg/mL 的最高剂量时均没有显示出对组织的毒性作用,与之形成鲜明对照的是,同样浓度的 N-9 已让组织活性降低至 69%。其中第 1 代杀微生物剂

(多聚阴离子聚合物) 中的 PRO2000 与硫酸糊精 (Dextrin sulphate) 分别在阴道用药剂量的 1/5 000 和 1/40 时即可达到 99% 的保护。第 2 代杀微生物剂 (逆转录酶抑制剂) 中 PMPA (9-[2-(phosphonomethoxy) peopyl]adenine) 可有效抑制病毒的剂量也只有阴道制剂的 1%。同时在宫颈、包皮等组织上的验证, 也显示出 PRO2000 等杀微生物剂在安全剂量范围内具有病毒抑制效果^[7,32-33]。

由于组织模型感染无法像细胞模型那样控制病毒的靶细胞数量, 病毒在其中的复制生长受到组织类型、培养方式、病毒接种等众多因素的影响, 这将影响对杀微生物剂评价结果的可重复性与可信度, 实验室之间的结果也难以比较。为此, Richardson-Harman 等^[34]报道了一种较为客观检测病毒生长状况及评价候选杀微生物剂的软终点法 (Soft-endpoint)。病毒生长曲线可分为 4 个阶段: 停滞期、指数增长期、稳定期和衰退期。软终点法是指无论病毒复制水平高低, 都将其在组织内生长的稳定期作为时间截取点进行 p24 等检测与统计, 这样便于分析和比较不同实验室得到杀微生物剂临床前比较的实验结果, 减少固有偏差。利用该方法判断病毒在直肠组织模型中生长的变异性最大。同时在该方法中病毒原始株及其进化分支是影响病毒复制的关键参数, 虽然组织类型与模型差异也是影响病毒复制的非常重要的参数, 但若使用同一类型组织时, 实验室间仍可以用 p24 水平及 IC₅₀ 来进行可靠的药效比较。

5 本实验室的活组织培养进展

本实验室已开展了包括结、直肠、包皮等组织来源的 Rafts 和 Transwell 培养模型。通过 Rafts 模型在对肠道黏膜的培养中, HE 染色观察第 5 天组织结构依然良好, 13 d 时黏膜结构依然可见。经 MTT 法检测培养 10 d 内的组织活性, 显示培养 4 d 时组织活性高于 80%, 7 d 的活性可保持在 50% 左右, 包皮培养存活状态优于肠道黏膜, 与其他实验室相比, 本实验对肠道组织与包皮组织的培养无论组织结构

的完整性保持或高活性的培养时间均优于已有的报道^[7,10], 建立的组织模型可以满足后续的实验要求。

药物的临床前安全性与有效性评价首先要求评价模型具有一定的敏感性, 本实验室用 10 倍浓度梯度的 N-9 分别与结肠黏膜孵育, 发现黏膜活性随 N-9 浓度的升高而降低, 即使将梯度差减小至 3 倍, 黏膜依然可以灵敏地反映出药物的毒性变化。此外, 对临床试验中证明安全的几种抗 HIV-1 药物进行平行观察, 对组织活性的影响较小, 而对照 N-9 组活性明显降低。

6 展望

人体组织培养模型中的组织块是在脱离了机体的情况下独立生存, 因此得出的研究结果还不能与人体感染的真实情况完全等同, 这点需要在数据分析中予以注意。同时, 组织培养模型还存在着一些争议和需要解决的问题, 例如, 组织来源的背景资料、抗生素等对组织激素水平的影响、靶细胞数量、结果的分析等^[35-37]。但不可否认的是, 组织培养模型, 尤其是人体组织来源的模型在 HIV-1 性途径感染的研究中具有不可替代的优势。

未来, 模型的构建和应用仍有较大的拓展空间。首先, 随着研究目的不同, 组织来源将不局限于现有类型。其次, 现有组织培养技术可进一步完善, 如借鉴临床外科的器官移植取材规范与体外保存技术, 以及对培养基成分的优化调整, 都将对改善组织存活状态有较大帮助。从本实验室的经验来看, 使用器官移植保存液作为组织离体后的运输液能更好的保持黏膜状态; 在机制研究中, 可向模型中加入人体微环境存在的介质或采用不同类型组织共同培养等方式以进一步模拟真实感染环境; 第三, 新的应用开发。将一些细胞或动物模型上难以培养的病毒用人体组织模型进行培养 (例如丙肝病毒等), 从艾滋病研究延伸到性传播疾病等更广泛的领域。在感染靶细胞间或受体间相互作用机制、局部免疫与炎症等研究以及公共卫生突发传染病病原体的快

速鉴定上进行突破。组织水平的安全性与有效性评价范围也可扩展涵盖至抗病毒药物以外的更多的生物预防性策略 (如疫苗等), 这些也将作为我们今后考虑的研究方向。

REFERENCES

- [1] Quinn TC, Overbaugh J. HIV/AIDS in women: an expanding epidemic. *Science*, 2005, 308(5728): 1582–1583.
- [2] Beyrer C. Global prevention of HIV infection for neglected populations: men who have sex with men. *Clin Infect Dis*, 2010, 50(Suppl 3): S108–113.
- [3] The Ministry of Health of the People's Republic of China, 2009 Update on the HIV/AIDS Epidemic in China. 2009-12-02. <http://www.moh.gov.cn>.
- [4] Miller CJ, Li Q, Abel K, et al. Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*, 2005, 79(14): 9217–9227.
- [5] Harrison RG, Greenman MJ, Mall FP, et al. Observation on the living developing nerve fiber. *Anat Rec*, 1907, 1(5): 116–128.
- [6] Wallace GS, Cheng-Mayer C, Schito ML, et al. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibitors impede transinfection in cellular and explant models and protect nonhuman primates from infection. *J Virol*, 2009, 83(18): 9175–9182.
- [7] Fischetti L, Barry SM, Hope TJ, et al. HIV-1 infection of human penile explant tissue and protection by candidate microbicides. *Aids*, 2009, 23(3): 319–328.
- [8] Herrera C, Cranage M, McGowan I, et al. Reverse transcriptase inhibitors as potential colorectal microbicides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(5): 1797–1807.
- [9] Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, et al. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity*, 2007, 26(2): 257–270.
- [10] Fletcher PS, Elliott J, Grivel JC, et al. *Ex vivo* culture of human colorectal tissue for the evaluation of candidate microbicides. *AIDS*, 2006, 20(9): 1237–1245.
- [11] Grivel JC, Margolis L. Use of human tissue explants to study human infectious agents. *Nat Protoc*, 2009, 4(2): 256–269.
- [12] Fleming SC, Kapembwa MS, MacDonald TT, et al. Direct *in vitro* infection of human intestine with HIV-1. *AIDS*, 1992, 6(10): 1099–1104.
- [13] Collins KB, Patterson BK, Naus GJ, et al. Development of an *in vitro* organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract. *Nat Med*, 2000, 6(4): 475–479.
- [14] Cummins JE Jr, Guarner J, Flowers L, et al. Preclinical testing of candidate topical microbicides for anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and tissue toxicity in a human cervical explant culture. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(5): 1770–1779.
- [15] Shen R, Drelichman ER, Bimczok D, et al. GP41-specific antibody blocks cell-free HIV type 1 transcytosis through human rectal mucosa and model colonic epithelium. *J Immunol*, 2010, 184(7): 3648–3655.
- [16] Bouschbacher M, Bomsel M, Verronese E, et al. Early events in HIV transmission through a human reconstructed vaginal mucosa. *Aids*, 2008, 22(11): 1257–1266.
- [17] Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog*, 2010, 6(4): e1000852.
- [18] Sivard P, Berlier W, Picard B, et al. HIV-1 infection of Langerhans cells in a reconstructed vaginal mucosa. *J Infect Dis*, 2004, 190(2): 227–235.
- [19] Amerongen HM, Weltzin R, Farnet CM, et al. Transepithelial transport of HIV-1 by intestinal M cells: a mechanism for transmission of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1991, 4(8): 760–765.
- [20] Saïdi H, Magri G, Nasreddine N, et al. R5- and X4-HIV-1 use differentially the endometrial epithelial cells HEC-1A to ensure their own spread: Implication for mechanisms of sexual transmission. *Virology*, 2007, 358(1): 55–68.
- [21] Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, et al. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*, 2002, 16(1): 135–144.
- [22] Maher D, Wu X, Schacker T, et al. HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11504–11509.
- [23] Gupta P, Collins KB, Ratner D, et al. Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency

- virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system. *J Virol*, 2002, 76(19): 9868–9876.
- [24] Saba E, Grivel JC, Vanpouille C, et al. HIV-1 sexual transmission: early events of HIV-1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized *ex vivo* model. *Mucosal Immunol*, 2010, 3(3): 280–290.
- [25] Hu Q, Frank I, Williams V, et al. Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *J Exp Med*, 2004, 199(8): 1065–1075.
- [26] Patterson BK, Landay A, Siegel JN, et al. Susceptibility to human immunodeficiency virus-1 infection of human foreskin and cervical tissue grown in explant culture. *Am J Pathol*, 2002, 161(3): 867–873.
- [27] Fahrbach KM, Barry SM, Anderson MR, et al. Enhanced cellular responses and environmental sampling within inner foreskin explants: implications for the foreskin's role in HIV transmission. *Mucosal Immunol*, 2010, 3(4): 410–418.
- [28] Bailey RC, Moses S, Parker CB, et al. Male circumcision for HIV prevention in young men in Kisumu, Kenya: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2007, 369(9562): 643–656.
- [29] Gray RH, Kigozi G, Serwadda D, et al. Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: a randomised trial. *Lancet*, 2007, 369(9562): 657–666.
- [30] Shen R, Richter HE, Clements RH, Novak L, et al. Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 2009, 83(7): 3258–3267.
- [31] Hillier SL, Moench T, Shattock R, et al. *In vitro* and *in vivo*: the story of nonoxynol 9. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005, 39(1): 1–8.
- [32] Rohan LC, Moncla BJ, Kunjara Na Ayudhya RP, et al. *In vitro* and *ex vivo* testing of tenofovir shows it is effective as an HIV-1 microbicide. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9310.
- [33] Greenhead P, Hayes P, Watts PS, et al. Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. *J Virol*, 2000, 74(12): 5577–5586.
- [34] Richardson-Harman N, Lackman-Smith C, Fletcher PS, et al. Multisite comparison of anti-human immunodeficiency virus microbicide activity in explant assays using a novel endpoint analysis. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(11): 3530–3539.
- [35] Shattock RJ, Griffin GE, Gorodeski GI. *In vitro* models of mucosal HIV transmission. *Nat Med*, 2000, 6(6): 607–608.
- [36] Gupta P, Collins K, Patterson B, et al. Reply to '*In vitro* models of mucosal HIV transmission. *Nat Med*, 2000, 6(6): 607–608.
- [37] Anderson DJ, Pudney J, Schust DJ. Caveats associated with the use of human cervical tissue for HIV and microbicide research. *AIDS*, 2010, 24(1): 1–4.