

HIV-1 感染小鼠动物模型建立及体内整合前病毒定量分析

高阳, 刘嘉睿, 王长俊, 马妍, 周颖, 董廷, 王涛, 孙语璐, 顾潮江*

武汉科技大学 生命科学与健康学院, 湖北 武汉 430065

高阳, 刘嘉睿, 王长俊, 马妍, 周颖, 董廷, 王涛, 孙语璐, 顾潮江. HIV-1 感染小鼠动物模型建立及体内整合前病毒定量分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2195-2210.

GAO Yang, LIU Jiarui, WANG Changjun, MA Yan, ZHOU Ying, DONG Ting, WANG Tao, SUN Yulu, GU Chaojiang. Establishment of a humanized mouse model of HIV-1 infection and quantification of integrated HIV proviral DNA *in vivo*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2195-2210.

摘要: 近年来, 多种新型抗人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)疗法如基因治疗、广谱中和抗体以及衍生的嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor modified T cell, CAR-T)疗法均迫切需要理想的动物模型及用于精准定量病毒基因组的方法。本研究通过双标 HIV 假病毒构建及感染获得 HIV- Δ ENV-Jurkat-EGFP-mCherry 稳转细胞, 并以该细胞基因组作为整合前病毒的标准品, 建立巢式荧光定量 PCR (nested quantitative polymerase chain reaction, nested-qPCR) 定量 HIV 整合前病毒。通过尾静脉注射健康人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)到 NOD/Prkdcscid/IL2rgnull (NPG)小鼠, 通过监测小鼠外周血中 hCD45⁺、hCD3⁺、hCD4⁺ 和 hCD8⁺人源化细胞的比例来判断人源化小鼠模型构建是否成功。腹腔注射 HIV NL4-3-NanoLuc 病毒, 随后通过小动物活体成像及分子病毒学评价 HIV 体内复制, 结果表明, 尾静脉注射正常人 PBMC 细胞至小鼠内 3-5 周后, 实验组小鼠体内均检测到人源免疫细胞的浸润, 建模 5 周后的人源化小鼠外周血中 hCD45 大于 25%, 即人源化小鼠模型构建成功。感染 27 d 后小动物活体成像能检测到病毒相关萤光素酶蛋白表达, 分子病毒学结果表明在脾脏中病毒总 DNA、RNA 和整合前病毒 DNA 分别达到了 18 000 copies/10⁶ cells、15 000 copies/ μ g RNA、15 000 copies/10⁶ cell。本研究证明了通过尾静脉注射正常人 PBMC, 可成功建立 HuPBMC-NPG/严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)人源化小鼠模型, 并且 HIV 病毒可成功感染该模型。本研究建立了有效测定 HIV 整合前病毒 DNA 的方法, 为艾滋病体内复制水平及病毒库大小和对多种新型抗 HIV 疗法的治疗效果的评价奠定了基础。

资助项目: 国家科技重大专项(2017ZX10202102-007); 湖北省自然科学基金(2019CFB529); 湖北省技术创新重大专项(2019ACA168)

This work was supported by the National Science and Technology Major Project of China (2017ZX10202102-007), the Hubei Provincial Natural Science Foundation (2019CFB529), and the Hubei Provincial Technological Innovation Special Project (2019ACA168).

*Corresponding author. E-mail: guchaojiang@wust.edu.cn

Received: 2023-12-13; Accepted: 2024-03-05

关键词：人源化小鼠；人类免疫缺陷病毒(HIV)；NPG免疫缺陷小鼠；外周血单个核细胞(PBMC)

Establishment of a humanized mouse model of HIV-1 infection and quantification of integrated HIV proviral DNA *in vivo*

GAO Yang, LIU Jiarui, WANG Changjun, MA Yan, ZHOU Ying, DONG Ting, WANG Tao, SUN Yulu, GU Chaojiang*

School of Life Science and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei, China

Abstract: In recent years, virological, pathological, and immunological studies need to be carried out for the emerging anti-human immunodeficiency virus (HIV) therapies such as gene therapy, broadly neutralizing antibodies, and the derived chimeric antigen receptor (CAR)-T immunotherapy, which necessitates suitable, simple, and inexpensive small-animal models and methods for accurate quantification of the viral genome in the HIV-1 infected. In our research, the HIV- Δ ENV-Jurkat-EGFP-mCherry cell line was engineered through the infection with a dual-labelled HIV pseudovirus. A nested quantitative PCR (nested-qPCR) method with the cellular genome as the integrated standard was established for the quantification of HIV proviral copies. We administered intravenous injections of healthy human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) into NOD/Prkdcscid/IL2rgnull (NPG) mice. To verify engraftment kinetics, we analyzed the percentages of hCD45⁺, hCD3⁺, hCD4⁺, and hCD8⁺ cells in the peripheral blood of hu-PBMC-NPG mice. To evaluate HIV-1 infection in hu-PBMC-NPG mice, we inoculated these mice with HIV NL4-3-NanoLuc by intraperitoneal (IP) injection. We then monitored the luciferase expression by the small animal imaging system and measured the viral load in the spleen by qPCR. The infiltration of human PBMCs in mice was detected 3–5 weeks after intravenous injection, and the percentage of hCD45 in humanized mouse PBMCs were more than 25% five weeks after IP inoculation. The expression of the virus-associated luciferase protein was detected by luciferase imaging 27 days post infection. Moreover, the viral total DNA, RNA, and proviral DNA copies reached 18 000 copies/10⁶ cells, 15 000 copies/ μ g RNA, and 15 000 copies/10⁶ cells, respectively, in the mouse spleen. Taken together, we reported a convenient method for building a simple humanized mouse model of HuPBMC-NPG/severe combined immunodeficiency (SCID) by intravenous injection with hu-PBMCs without advanced surgical skills and irradiation. Furthermore, we established a convenient method for the efficient determination of proviral DNA to assess HIV replication *in vivo*, viral reservoir sizes, and efficacy of novel anti-HIV therapies including CAR-T immunotherapy and gene therapy.

Keywords: humanized mice; human immunodeficiency virus (HIV); NOD/Prkdcscid/IL2rgnull (NPG) mice; peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)导致的获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS),即艾滋病,是严重威胁人类生命健康的全球性疾病,主要破坏人体内 CD4+T 淋巴和单核-巨噬细胞从而导致免疫功能衰竭,引起各种机会性感染或肿瘤的慢性高致命性传染病^[1]。自 1996 年高效抗逆转录病毒治疗(highly active antiretroviral therapy, HAART)问世已有 20 多年历史,但在临床上艾滋病至今仍然无法治愈,其中一个重要原因就是 HIV-1 仅仅对人类及类人猿具有感染性及致病性,缺乏理想的动物疾病模型来揭示 HIV-1 潜伏感染导致 AIDS 的分子机制,这极大阻碍了 HIV-1 感染的预防性疫苗和新型治疗药物方面的突破性进展^[2-3]。

猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)感染非人灵长类动物来建立体内动物感染模型,在研究 HIV-1 潜伏库中存在明显的优势,可同时对动物多器官多系统进行研究,且病毒感染引起的免疫反应与人类十分类似^[4]。但 SIV 与 HIV-1 基因组序列相似性仅有 40%,遗传差异较大,从而使得 SIV 不能直接代替 HIV-1 用于 HIV/AIDS 的研究,并且非人灵长类动物模型成本较高、周期较长,也使此类模型在 HIV/AIDS 的研究中没有得到广泛的应用^[5-7]。近年来,小鼠作为动物模型备受重视,因为鼠类动物存在体型小、成本低廉、饲养简单、方便操作和繁殖迅速等诸多优势,目前已广泛应用于实验室和临床研究。但是由于小鼠细胞本身没有人 CD4 受体,无法被 HIV-1 病毒感染,故不能直接用于 HIV-1 的研究^[8]。NOD/Prkdcscid/IL2rgnull (NPG)人源化小鼠模型即在 NOD/重度联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)背景下通过引入白细胞

介素-2 (interleukin-2, IL-2)受体蛋白的 γ 链基因(IL2rg)敲除小鼠,表现为细胞免疫和体液免疫的重度联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID),通过移植成熟的人类免疫细胞,包括外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)等,来重建小鼠的免疫系统,该模型因其能模拟天然 HIV-1 感染人类免疫系统而被广泛应用^[9]。

本研究旨在通过尾静脉注射人源外周血 PBMCs 细胞构建人源化小鼠模型;同时对于人源化成功的小鼠,通过腹腔注射 HIV-1 NL4-3-NanoLuc 病毒液进行感染,进行活体成像定位和定量病毒的蛋白表达,通过实时荧光定量 PCR 从分子水平定量 HIV 感染小鼠模型体内病毒 RNA、总 DNA 及整合前病毒 DNA,并初步评估病毒库的大小,可作为 HIV 药物治疗和细胞治疗的评价模型^[10]。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞

NPG 小鼠购自维通达生物技术有限公司,隔离盒饲养于武汉科技大学无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级屏障环境(感染前)及中国科学院武汉病毒研究所生物安全三级实验室(感染后)中,饲料、水、垫料均经高温高压灭菌。小鼠 6 周龄,实验前适应性饲养;实验注射 PBMCs 来源于武汉市中心血站中健康人外周血。本文用到的小鼠动物实验经武汉科技大学动物伦理委员会批准,批准号为[SYXK(鄂)2018-0045]。

1.2 试剂和仪器

人淋巴细胞分离液、Furimazine 及红细胞裂解液购于北京索莱宝科技有限公司;RPMI 1640 细胞培养液购于 Hyclone 公司;阿巴卡韦(ABC)

和雷特格韦(RAL)购于 MedChem Express 公司; Lenti-X p24 快速滴度试剂盒购于 TaKaRa 公司; 抗人 CD45-PE、CD3-APC、CD4-FITC、CD8-pacific Blue 抗体购于 BD 公司, 并使用 BD 公司流式细胞仪进行检测; 实时荧光定量 PCR 法试剂盒购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司。荧光定量 PCR 仪购于 Bio-Red 公司; 落地式水平离心机由 Eppendorf 公司生产; 小鼠组织研磨器购于北京天根生化科技有限公司; 小动物活体光学成像系统购于 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 人外周血单核细胞(PBMCs)的分离

采自武汉市中心医院健康人的静脉血, 肝素钠抗凝后, 于室温下 $650\times g$ 离心 15 min, 去上层血浆, 下层血细胞用等体积生理盐水稀释, 颠倒混匀后, 轻轻加入已经铺好的淋巴细胞分离液(Ficoll)中, 室温 $650\times g$ 离心 30 min。轻轻吸取单个核细胞(白膜层)加入 3 倍体积生理盐水清洗一次, 室温 $300\times g$ 离心 10 min。离心后加入红细胞裂解液 10 mL 重悬, 静置 5 min 至液体澄清。后补加 PBS 至 45 mL, 室温 $450\times g$ 离心 10 min, 使用生理盐水重悬人 PBMC 细胞至 2.5×10^7 cells/mL。

1.4 Hu PBMC-NPG 人源化小鼠的构建及流式检测

该部分实验于 SPF 级动物房中完成。具体实验方式为: 选取合适的 6 周龄 NPG 小鼠经过适应性培养 3 d 后, 分为 4 组, 每组各 5 只, 保持 4 组小鼠在体重、状态等相对一致。在 SPF 级屏障环境中, 给予 4 组小鼠尾静脉注射 5×10^6 cells/只人 PBMC 进行人源化免疫重建。

PBMC 注射小鼠后, 分别在第 3 周和第 5 周收集小鼠颌下静脉血约 150 μ L/只, EDTA 抗凝; 加入全血 2 倍体积的红细胞裂解液, 冰上裂解 10 min, $500\times g$ 离心 10 min 去上清, 100 μ L 生

理盐水重悬细胞。分别加入人 CD45+、CD3+、CD4+、CD8+抗体, 4°C 染色 30 min, 洗涤 3 次后通过流式细胞仪检测小鼠外周血中存活的人淋巴细胞 CD45+、CD3+、CD4+、CD8+比例^[11]。

1.5 Hu PBMC-NPG 人源化小鼠 GVHD 评分

移植后小鼠每周进行移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)评分, GVHD 临床表现包括体重下降、活动度、姿势、耸毛和皮肤溃疡 5 项, GVHD 临床评分由这 5 项相加组成^[12]。

1.6 NL4-3-NanoLuc 病毒构建及包装

以本实验室保存的 HIV B 亚型的表达质粒 pNL4-3 为骨架, 利用 *Xho* I 限制性酶切位点, 在 *Env* 基因和 *Nef* 基因间依次插入海肾萤光素酶 *NanoLuc* 基因、*linker* 和 *IRES*, 从而获得 pNL4-3-NanoLuc 质粒。在生物安全三级实验室转染 HEK293T 细胞, 72 h 后收获上清, 分别依次 $300\times g$ 5 min、 $3\ 000\times g$ 30 min 和 $30\ 000\times g$ 180 min 离心获得高纯度的 NL4-3-NanoLuc 病毒。

1.7 病毒 p24 蛋白定量、TCID₅₀ 检测及感染验证

将 p24 标准品稀释成 5 个梯度(200、100、50、25、12.5 pg/mL), 以 DMEM 基础培养基为介质, 将病毒上清稀释至 10^{-5} 和 10^{-6} , 并设定稀释液为空白对照。根据实验设计在 96 孔板中确定样品位置, 将标准品、样品以及空白对照各 200 μ L 加入包被孔中, 盖上保护盖。每孔中加入 20 μ L 裂解液, 并于 37°C 恒温培养箱中孵育 60 min。去上清, 用 300 μ L 的洗涤液清洗 96 孔板, 并反复清洗 5 次。每孔中加入 100 μ L 的 p24 生物素偶联抗体, 并于 37°C 恒温培养箱中孵育 60 min。去上清, 用 300 μ L 的洗涤液清洗 96 孔板, 反复清洗 5 次。每孔中加入 100 μ L 的链霉素-辣根结合物, 并于室温($18\text{--}25^\circ\text{C}$)孵育 30 min。去

上清,用 300 μL 的洗涤液清洗 96 孔板,反复清洗 5 次。将 100 μL 的结合底物添加到每个孔洞中,在室温下(18–25 $^{\circ}\text{C}$)避光孵育 20 min。孵育完成后,每孔加入 100 μL 终止液(stop solution for TMB substrate)。反应 1 min 后,将酶标仪的吸收波长设置为 450 nm 进行测定。对数据进行处理,绘制标准曲线并进行拟合,对细胞培养上清中的假病毒的 p24 值进行计算并对其进行定量^[13]。

取 TZM-bl 细胞以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板中,16 h 后轻轻弃去上清。用含有 10% FBS 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DEAE-dextran 的 DMEM 完全培养基梯度稀释病毒原液,顺序得到稀释梯度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 的病毒稀释液各 1 mL。每孔加入 100 μL 病毒稀释液,每组 10 孔,将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中继续培养。96 h 后每孔补充 DMEM 完全培养基 50 μL ,144 h 后每孔补充 DMEM 完全培养基 50 μL ,168 h 后弃上清每孔加入 100 μL 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Furimazine 进行荧光检测。当荧光值大于阴性孔的 3 倍,该孔即为阳性孔,否则为阴性孔。根据记录的各组阳性孔数量和阴性孔数量,采用 Reed-Muench 两氏法计算公式计算每 0.1 mL 假病毒原液 TCID₅₀ 值。公式如下:

距离比例 = (高于 50%阳性率的百分数 - 50%) / (高于 50%阳性率的百分数 - 低于 50%阳性率的百分数)。

$\lg \text{TCID}_{50} = \text{距离比例} \times \text{稀释度对数之间的差} + \text{高于 50\%阳性率的稀释度的对数}$ 。

再根据高于 50%阳性率的假病毒稀释液稀释度的对数,计算出每 0.1 mL 病毒原液的 TCID₅₀ 活性滴度^[14]。

1.8 HIV-1 小鼠感染模型的鉴定及治疗

此部分实验在生物安全三级实验室进行,NL4-3 病毒株是 HIV CXCR4 趋向的野生型毒

株,具备感染人外周血 CD4+T 细胞的特性^[15]。建模 5 周后,将小鼠分成 3 组,每组各 5 只,其中低剂量组 2 组,腹腔注射每只 2×10^5 TCID₅₀ 的重组病毒和高剂量组 1 组,腹腔注射 4×10^5 TCID₅₀ 的重组病毒,感染 16 d 和 27 d 后以每只 150 mg/kg 剂量腹腔注射 150 μL Furimazine 成像底物。并以异氟烷气体麻醉小鼠,5 min 后使用 IVIS 小动物活体成像系统(Xenogen, Hopkinton)收集光信号,活体成像的数据用软件 Living image (version 4.0)进行标准化处理,光密度强度及定位能反映病毒在动物机体的复制水平及病毒储藏库位点。当荧光信号 ROI 值达到 10^6 – 10^7 photons/(s·cm²)即可判定感染模型构建成功。阿巴卡韦(Abacavir,ABC)和拉替拉韦(Raltegravir,RAL)溶解于生理盐水中,对低剂量感染小鼠灌胃给药,剂量分别为 150 mg/(kg·d)和 100 mg/(kg·d)^[16]。

1.9 HIV-1 感染小鼠脾脏和血液组织病毒 DNA、RNA 定量

提取感染病毒 5 周后小鼠的脾脏和血液组织中总 DNA 和 RNA,选取特异性 gag 引物探针(表 1),通过实时荧光定量 PCR 的方法(表 2、表 3),对感染小鼠脾脏和血液组织 DNA 中的 gag 基因的拷贝数进行定量,同时以 β -globin 作为内参基因,选取特异性 β -globin 引物探针定量每 μL 感染小鼠组织 DNA 中 β -globin 基因拷贝数,并用于基因拷贝数的归一化处理,计算得到每 10^6 组织细胞中 gag 基因 DNA 的拷贝数。总 RNA 经过逆转录(reverse transcription, RT)后,通过实时荧光定量 PCR 的方法,对感染小鼠脾脏和血液组织 RNA 中的 gag 基因的拷贝数进行定量,以人 GADPH 基因作为内参基因,选取特异性人 GADPH 引物探针定量每 μL RNA 浓度,对定量的 gag RNA 进行归一化处理,计算得到每 μg RNA 中 gag 基因 RNA 的拷贝数。

表 1 荧光定量 PCR 引物和探针

Table 1 The sequence of primers/probes used for qPCR analysis

| Primer name | Primer sequence (5'→3') | Size (bp) |
|-------------------|-----------------------------------|-----------|
| Gag-F | GGACCAGGAGCGACACTAGAA | 21 |
| Gag-R | CAGCCAAAACCTCTTGCTTTATGG | 22 |
| Gag-P | FAM-GTGCTAAGCAGTTGGTGGT-MGB | 19 |
| HGADPH-F | ACAGCCTCAAGATCATCAGCA | 21 |
| HGADPH-R | ATGAGTCCTTCCACGATACCA | 21 |
| HGADPH-P | FAM-GTGCTAAGCAGTTGGTGGTGCAGGA-MGB | 25 |
| β -globin F | CACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCT | 26 |
| β -globin R | TCATAATATCCCCAGTTTATAGTAGTTGG | 28 |
| β -globin-P | FAM-CTGTCCAATTTCTATTAAG-MGB | 20 |
| LTR-R | GGCGCCACTGCTAGAGATTTT | 21 |
| Alu-F | CTCACGCCTGTAATCCCAGCA | 21 |

表 2 荧光定量 PCR 反应体系

Table 2 The reaction system of qPCR analysis

| Reaction system | Amount added (μ L) |
|---|-------------------------|
| 2 \times AceQ qPCR Probe Master Mix | 12.5 |
| Forward primer (HIV-1 12.0 F) | 0.5 |
| 90 μ mol/L | |
| Reverse primer (HIV-1 12.0 R) | 0.5 |
| 90 μ mol/L | |
| TaqMan probe (HIV-1 12.0 P) | 0.5 |
| 10 μ mol/L | |
| H ₂ O (RNase and DNase free) | 10.0 |
| Template | 1.0 |

表 3 实时荧光定量 PCR 反应程序

Table 3 The reaction procedures for qPCR

| Temperature ($^{\circ}$ C) | Time | Cycle |
|-----------------------------|-------|-------|
| 37 | 3 min | 1 |
| 95 | 5 min | 1 |
| 95 | 10 s | 45 |
| 60 | 30 s | |
| 72 | 5 min | 1 |

1.10 HIV 感染小鼠体内整合前病毒 DNA 的定量

为了量化小鼠细胞中 HIV 整合前病毒的拷贝数,我们首先建立了整合标准曲线,并经过两轮 PCR 扩增,包括第一轮 12 个循环的线性预扩增(表 4),然后进行巢式实时荧光定量 PCR 检测。

以本实验室构建 Jurkat-EGFP-mCherry 双标细胞的基因组 DNA 作为 HIV 的整合标准品,

Jurkat-EGFP-mCherry 双标细胞由囊膜 gp120 缺陷的 HIV NL4-3 质粒和水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV-G)囊膜质粒共感染包装假病毒感染,该假病毒感染细胞后无法复制产生子代病毒,经细胞传代 20 代后,非整合 HIV 基因组拷贝被极大稀释而拷贝数极低,提取 20 代后的细胞基因组总 DNA,选取 gag 区引物探针及标准品对该整合 HIV 基因组标准品进行绝对定量,定量后作为检测 HIV-1 前病毒整合的标准品^[17]。

从整合 HIV 基因组 DNA 浓度为 10^5 拷贝数/ μ L 的标准品起始,连续 10 倍稀释,同时加入未感染细胞的基因组 DNA,保证各个浓度梯度标准品 DNA 总浓度大致相同,确保各个浓度的扩增效率一致。首先在第一轮 12 个循环预扩增中,整合标准品加入人宿主细胞基因组锚定引物 Alu-F 和 HIV 特异性引物 LTR-R(表 1),待测样品定量组加入 Alu-F 和 LTR-R,待测样本对照组仅加入 LTR-R。利用 HIV 第 12 对引物探针对于第一轮预扩增产物进行绝对定量,以整合标准品作为标准曲线分别待测样品定量组和对照组的拷贝数,然后每管待测样本的整合拷贝数等于待测样本定量组减去待测样本对照组的拷贝数,同时根据已经测定的每 μ L β -globin 基因拷贝数进行归一化处理,计算得到每 10^6 细胞中 HIV 整合前病毒 DNA 的拷贝数。

表 4 第一轮预扩增 PCR 反应程序

Table 4 Procedures for the first round of pre-amplified PCR reactions

| Temperature (°C) | Time | Cycle |
|------------------|-------|-------|
| 95 | 3 min | 1 |
| 95 | 15 s | 12 |
| 55 | 15 s | |
| 72 | 8 min | |
| 72 | 5 min | 1 |

1.11 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 统计学软件对实验数据进行分析。呈正态分布的计量数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 组间及多组的两组间数据比较采用 Student' *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 NL4-3-NanoLuc 病毒表达质粒构建及包装病毒感染性验证

以本实验室保存的 HIV B 亚型表达质粒

pNL4-3 为骨架, 成功构建 pNL4-3-NanoLuc 质粒(图 1A)。酶联免疫吸附反应检测包装病毒的 P24 蛋白含量, 绘制标准曲线, 测得包装病毒原液 P24 蛋白含量为 1.8×10^7 pg/mL, 检测病毒活性滴度 TCID₅₀ 为 $10^{-6.74}/0.1$ mL (图 1B)。通过萤光素酶系统检测, 成像结果证明包装的病毒具有感染 TZM-bl 细胞的能力(图 1C)。

2.2 NPG 小鼠模型体内人源细胞检测

在 PBMC 注射建模后第 3 周和第 5 周, 通过颌下静脉采血、裂解红细胞得到小鼠外周血单核细胞, 再经过 hCD45/CD3/CD4/CD8 多色标记抗体染色和流式细胞仪分析, 结果表明, 人 PBMC 建模 3 周和 5 周后 hCD45+ 阳性的人源细胞在小鼠外周血中的比例分别为 47.9% 和 83.5%, 均满足人源细胞占比大于 25% 的标准(图 2A), 5 周后 hCD3 在 hCD45+ 细胞群中占比达到 98.7% (图 2B)。在 CD3+T 细胞群中表达 CD4+ 和 CD8+ 阳性细胞各占 27.5% 和 65.2%, 在这群细胞中除了 CD4+ 和 CD8+ 单阳性 T 细胞, CD4+CD8+ 双阳性 T 细胞的

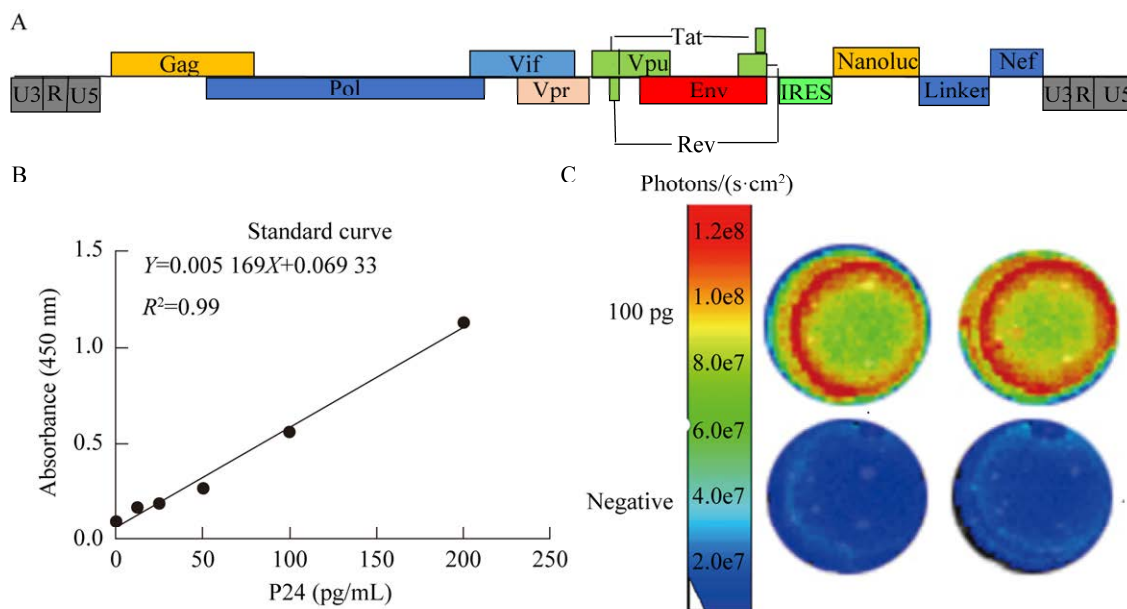


图 1 NL4-3-NanoLuc 病毒表达质粒构建、病毒包装及其感染性验证

Figure 1 Schematic diagram of NL4-Nanoluc plasmid, viral packaging and infectivity validation. A: NL4-Nanoluc plasmid backbone. B: Viral P24 assay. C: Virus infectivity verification.

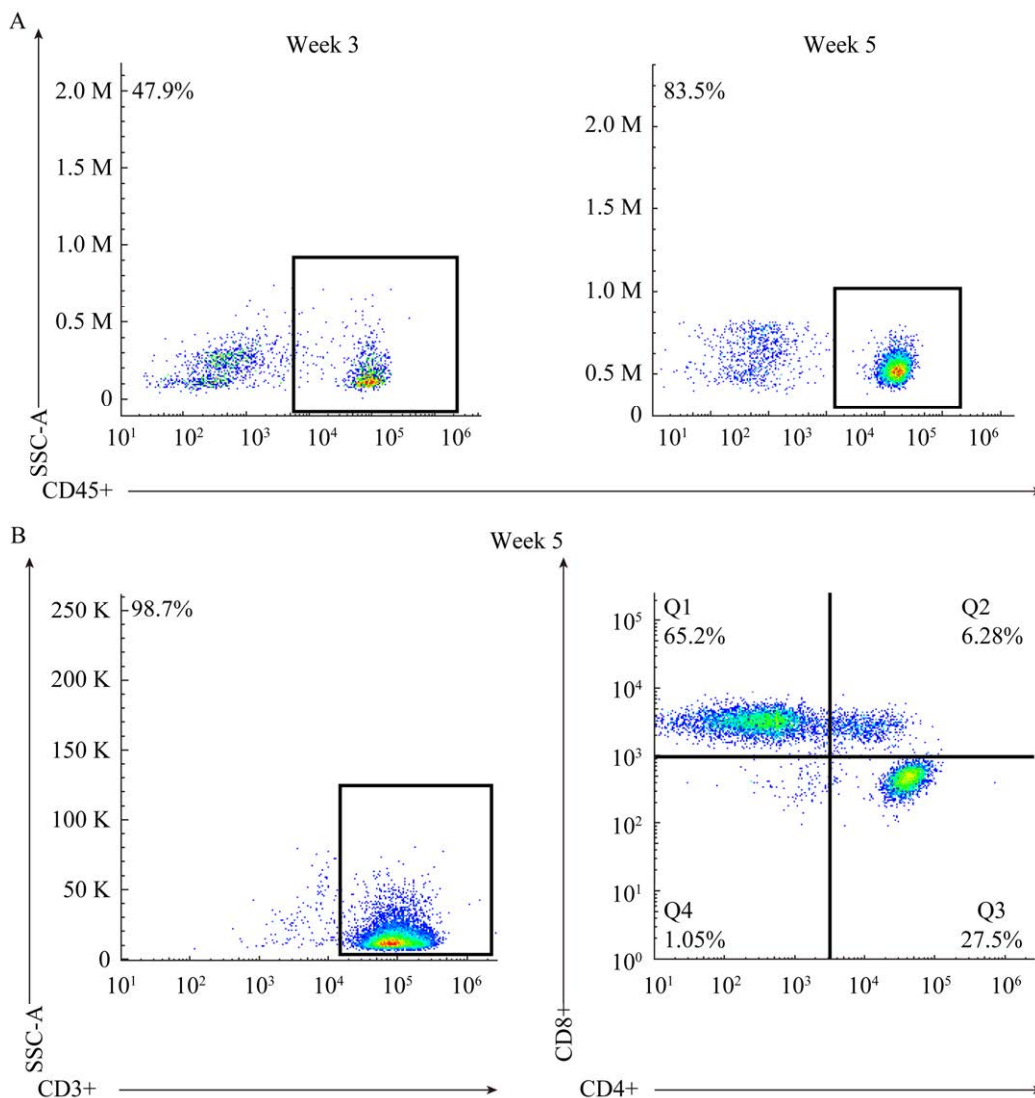


图2 人源化小鼠外周血 hCD45+/hCD3+/hCD4+/hCD8+ T 细胞比例分析

Figure 2 Flow cytometric analysis of percentage of hCD45+/hCD3+/hCD4+/hCD8+ T cell in humanized mice after intravenous inoculation of human PBMC. A: The percentage of hCD45+ in peripheral blood of humanized mice at week 3 and week 5. B: The percentage of CD4+ and CD8+ T cells in CD3+ positive T cells population.

比例为 6.28%。以上结果证明通过尾静脉注射人 PBMC 后, 人源细胞在小鼠体内增殖分化, 5 周后成功构建 NPG 人源化小鼠模型, 可以开始 HIV-1 小鼠感染模型的建立。

2.3 HIV 感染小鼠模型的构建

小鼠人源化建模及鉴定实验设计见图 3A, 待小鼠外周血中 hCD45+ T 细胞超过 25% 时, 通过腹腔注射 NL4-3-NanoLuc 病毒液进行感染,

感染当天, HAART 治疗组小鼠开始灌胃给药, 每天 2 次, 间隔 12 h。人源化小鼠在感染后第 16 天和第 27 天进行小动物活体成像检测 HIV 病毒在体内分布和病毒复制水平。低剂量组和高剂量组成像荧光强度随时间延长而呈现增强趋势, 均显著高于 HAART 治疗组(图 3B)。HAART 治疗组成像荧光强度随着药物治疗时间延长而降低, 表明临床抗病毒药物同样能够高效抑

制 HIV 在小鼠体内的复制。小鼠感染 27 d 后, 低剂量组和高剂量组荧光信号 ROI 值达到 10^6 – 10^7 photons/(s·cm²), HIV 病毒携带标签荧光素酶蛋白表达与病毒的复制水平和在小鼠体内的分布直接相关^[18](图 3C)。以上结果表明, 从低剂量组、高剂量组和 HARRT 治疗组的荧光素酶表达证明 HIV-1 病毒能成功感染人源化小鼠模型, 且病毒感染水平与起始接种剂量呈正相关。同时从注射 PBMCs 后, 每周对人源化小鼠

进行体重监测(图 3D)和 GVHD 评分(图 3E), 结果表明在整个人源化和建立病毒感染模型及抗病毒检测的实验过程(9 周)中, 小鼠未出现明显 GVHD。

2.4 实时荧光定量 PCR 定量小鼠体内病毒载量

在 NL4-3-NanoLuc 病毒感染 27 d 时, 对小鼠脾脏组织的 HIV-1 总 DNA 和 RNA 水平进行实时荧光定量 PCR 测定, 图 4A 为扩增曲线,

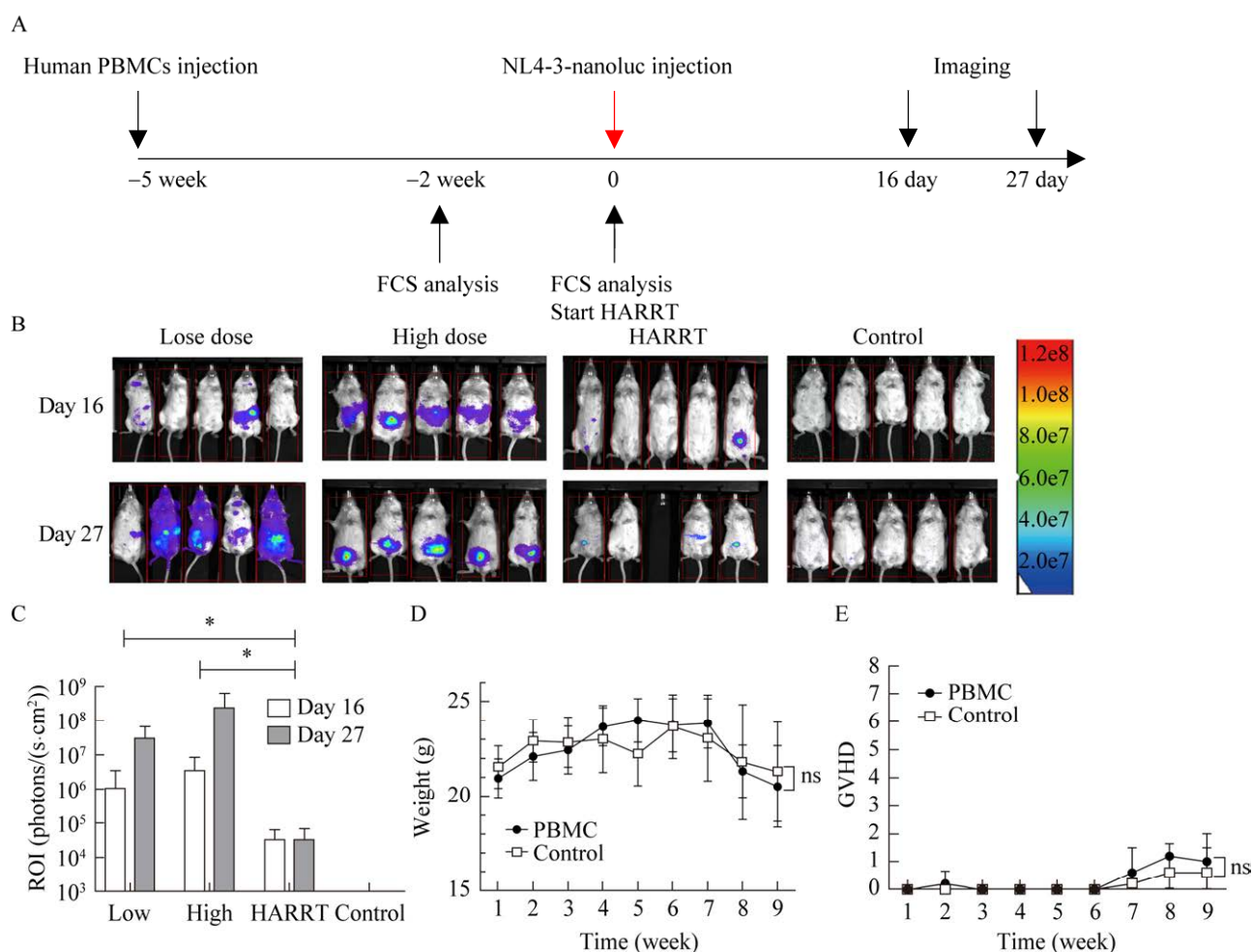


图 3 HIV 感染人源化小鼠模型成像

Figure 3 Identification of Hu-PBMC-NPG mice as an HIV-1 infection model by imaging system. A: Schematic design for HIV-1 infected mouse model. B: Measurement of the nano luciferase expression by imaging on day 16 and 27 after HIV infection. C: Quantification analysis of Nanoluc(Nluc) luciferase bioluminescence intensity in the HIV infected mouse model. D: Body weight assessment of mice throughout nine weeks following humanization modeling. E: GVHD assessment was evaluated at week 9 following humanization modeling. * $P < 0.05$; ns: Not significant.

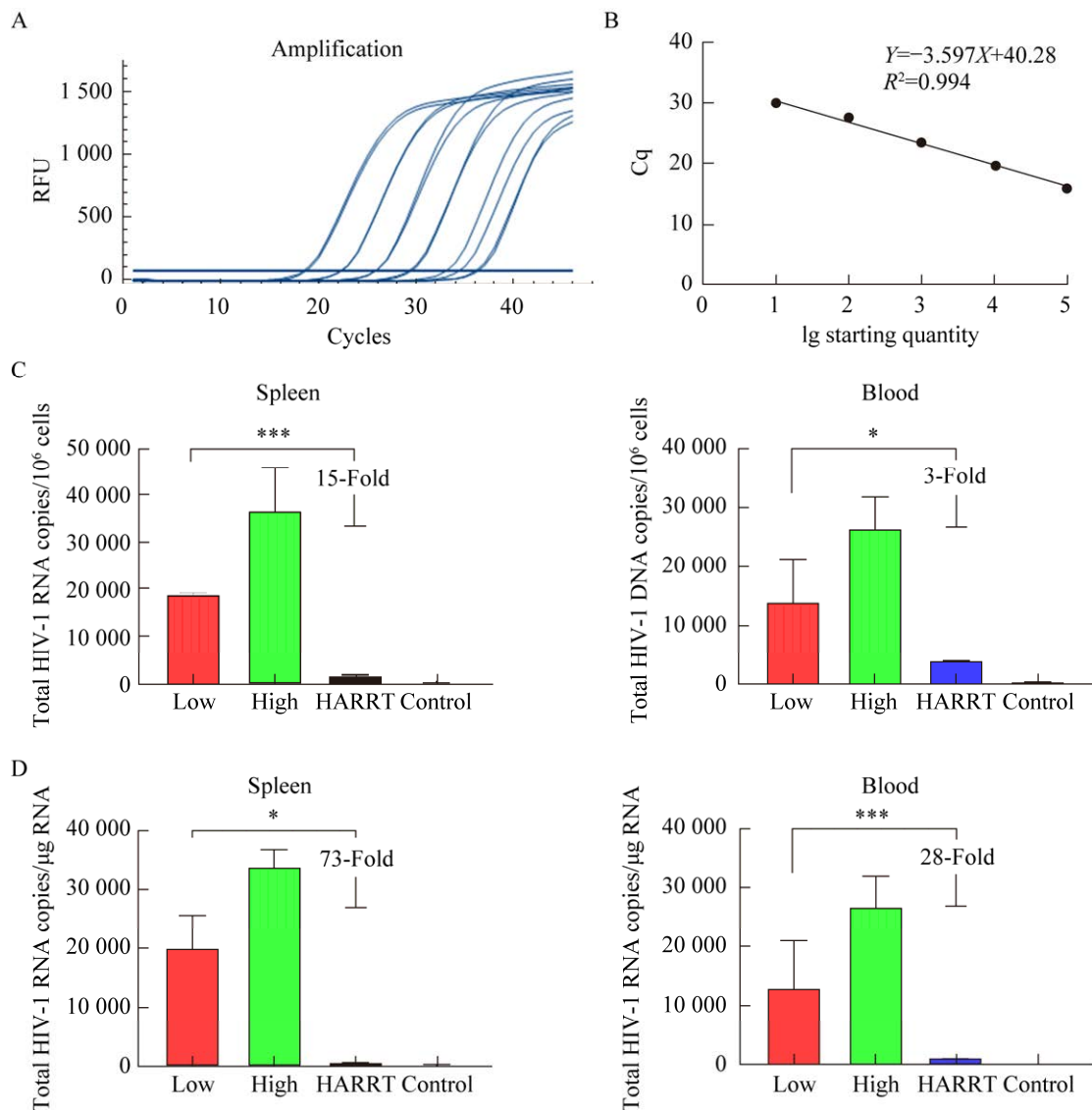


图 4 HIV-1 病毒总 DNA、RNA 定量标准曲线及人源化小鼠病毒定量

Figure 4 Quantification of viral total DNA and RNA in blood and spleen in HIV infected mouse model.

A: Amplification curve of real-time PCR based on *gag* region. B: The standard curve was generated by logarithmic regression of the amplified standard sample signals. C: The viral DNA load in spleen and blood tissues of humanized mice 27 days postinfection. D: The viral RNA load in spleen and blood tissues of humanized mice 27 days postinfection. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

图 4B 为标准曲线，该方法定量范围为 10^1 – 10^6 copies/ μL 样本。结果显示，未感染对照组扩增后无荧光信号产生，低剂量感染 27 d 后人源化小鼠脾脏组织中病毒 DNA 拷贝数达到 18 000 copies/ 10^6 cells, RNA 拷贝达到 20 000 copies/ μg , 低剂量感染并经 HARRT 治疗组小鼠脾脏组织病毒

DNA 比未治疗组降低了 93.6%，病毒 RNA 表达降低了 98.6%；其外周血中病毒 DNA 降低了 70.9%，RNA 表达降低了 96.5%，而在高剂量组病毒 DNA 拷贝数为 35 000 copies/ 10^6 cells, RNA 表达为 32 000 copies/ μg (图 4C、4D)。以上分子病毒学检测结果表明 HIV 病毒能有效感染人源化

小鼠,且体内病毒表达水平具有剂量依赖性,同时,HAART 治疗能够大大抑制小鼠体内病毒复制。

2.5 HIV 整合前病毒 DNA 测定方法建立及定量

HIV-1 病毒基因组整合到宿主细胞染色体中是病毒生命周期的重要步骤,整合后形成的潜伏病毒库是 HIV-1 感染不能被治愈的最大影响因素。定量整合前病毒水平,可作为间接评价抗

病毒治疗是否有效减少病毒库规模最有效的方法。本实验室建立了 nested-qPCR 方法用于测定整合前病毒量,包括:(1) Jurkat-EGFP-mCherry 双标记细胞系构建及整合标准品制备;(2) 标准品及待测样本的 12 个循环的预扩增;(3) 所有预扩增产物荧光 PCR 再定量(图 5A、5B),实验设计(图 5C),Alu-F 和 LTR-R 双引物预扩增曲线及 LTR-R 单引物单向扩增曲线(图 5D)。

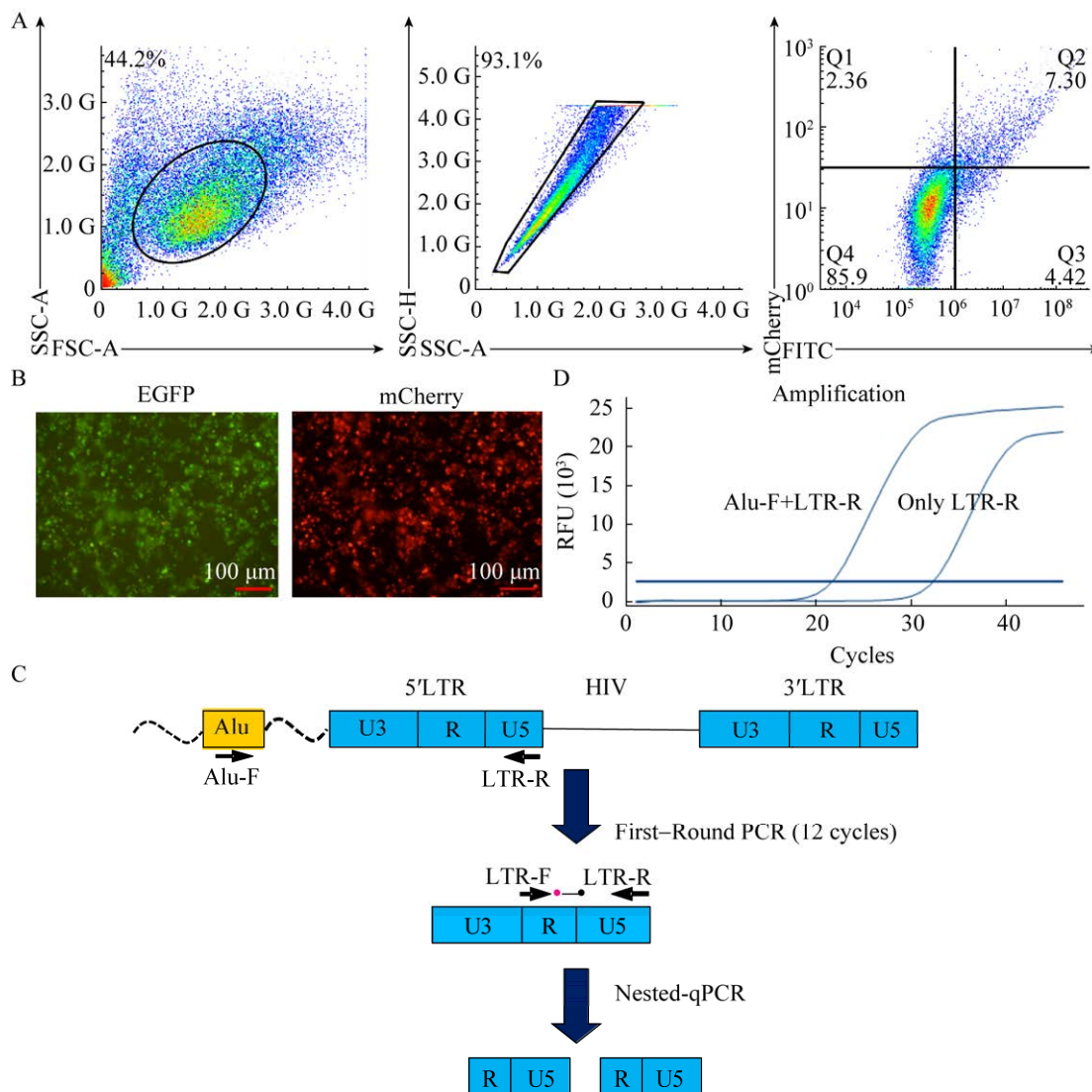


图 5 HIV-1 整合前病毒 DNA 定量方法建立

Figure 5 Establishment of nested-qPCR for quantification of integrated HIV-1 DNA. A: The strategy of flow cytometry and cell sorting for Jurkat-EGFP-mCherry double-labelled cell lines. B: Fluorescence imaging of Jurkat-EGFP-mCherry cell line. C: Schematic representation of strategy for assay of integration. D: Validation of the Alu-LTR pre-amplification curve with or without Alu anchor primer.

HIV 整合前病毒标准品荧光定量扩增曲线见图 6A, 绘制标准曲线(图 6B), 该方法能够准确定量范围为 10^1 – 10^5 copies/ μ L。在 HIV-1 (NL4-3-NanoLuc)病毒感染 27 d 时, 对小鼠脾脏组织的 HIV-1 整合前病毒 DNA 拷贝数进行

nested-qPCR 测定, 结果显示, 阴性对照组无荧光信号产生, 低剂量感染 HIV-1 27 d 后人源化小鼠脾脏组织中整合病毒基因组 DNA 达到 $1\ 500$ copies/ 10^6 cells, 而在 HAART 治疗后, 脾脏组织中整合前病毒载量降低了 74.4%, 血液组

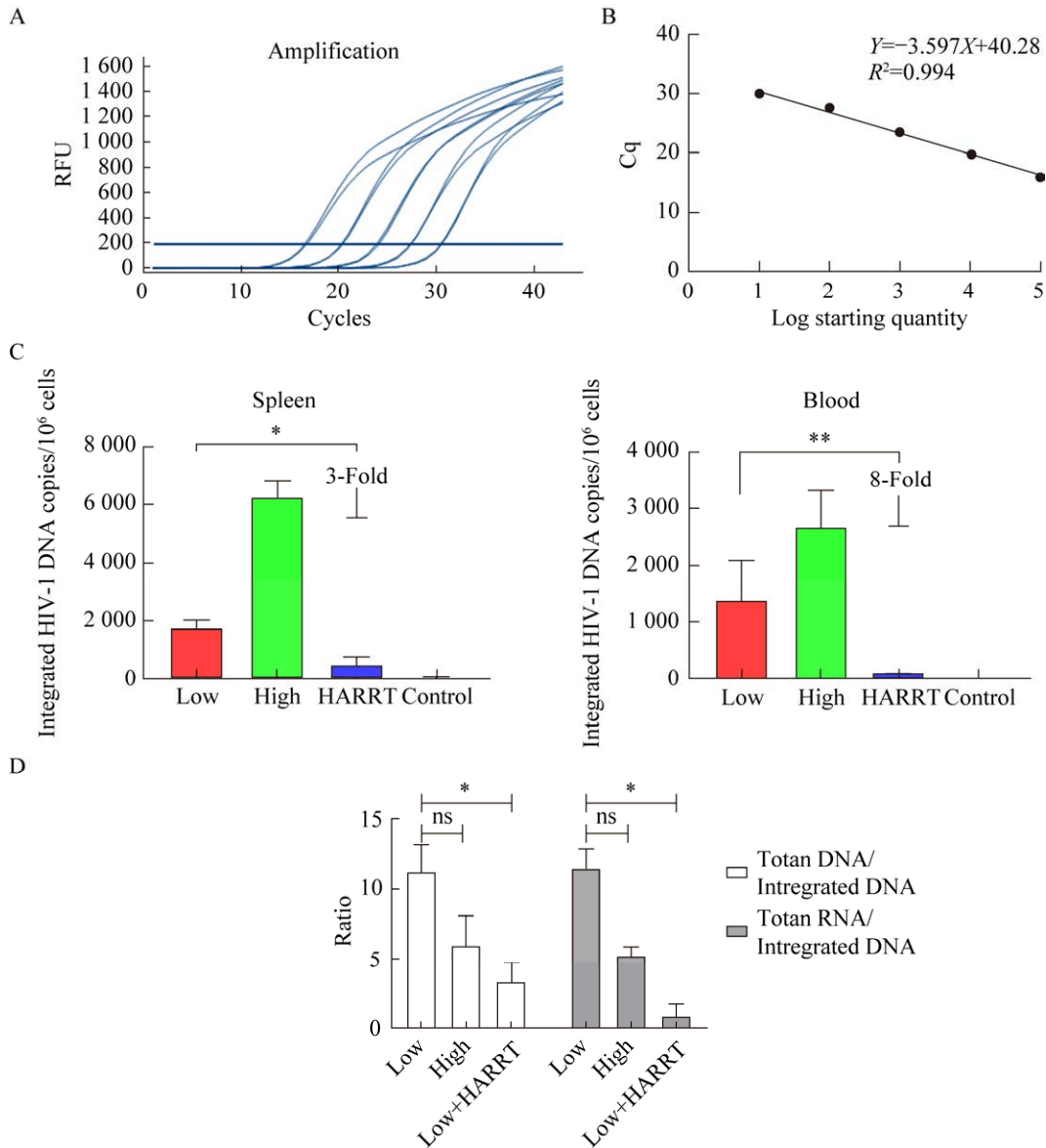


图 6 HIV-1 整合前病毒 DNA 定量标准曲线及人源化小鼠脾脏和血液中病毒整合 DNA 定量

Figure 6 HIV integrates efficiently in the humanized PBMC in mouse model. A: Amplification curve of nested-qPCR for HIV integration. B: The standard curve was generated by logarithmic regression of the amplified. C: The integrated proviral DNA was measured by nested-qPCR in spleen and blood tissues of humanized mice 27 days postinfection. D: The ratios of total DNA/integrated DNA and total RNA/integrated DNA was analyzed in spleen of humanized mice 27 days postinfection. ns: Not significant; * P <0.05; ** P <0.01.

织中整合前病毒载量降低了 88.1% (图 6C), 同时, 与总 DNA 和总 RNA 定量结果一致, 脾脏和血液组织内整合前病毒载量也与感染剂量呈正相关。对脾脏组织中的总 DNA、总 RNA 及整合前病毒 DNA 进行综合分析, 结果表明 HARRT 治疗组可以显著降低总 DNA/integrated DNA 和总 RNA/integrated DNA 的比例(图 6D)。说明 HARRT 治疗可以同时降低病毒整合水平和 HIV RNA 表达水平, 结果与临床 HIV-1 感染的 HARRT 结果高度一致, 进一步验证了该 HIV 感染动物模型能有效模拟 HIV 感染者体内的抗病毒机制。

3 讨论与结论

长期以来, 缺乏可用于体内测试 HIV-1 感染的小动物模型是制约 HIV-1 研究的一大障碍, 而选择非人灵长类动物作为动物模型成本较高、周期较长, 这大大限制了对艾滋病相关疾病机制与疫苗开发的研究^[19]。由人 PBMC 衍生的人源化小鼠模型为 HIV 感染的病理研究及治疗提供了新的有效途径。NPG 小鼠模型是将获得的 *IL2RG* 基因敲除小鼠, 回交到 NOD-SCID 背景建立的 T 细胞、B 细胞以及 NK 细胞缺失的高度免疫缺陷模型, 表现为细胞免疫和体液免疫的重度联合免疫缺陷^[20-22]。NPG 小鼠是迄今世界上免疫缺陷程度最高的工具小鼠, 且与 NOD-SCID 小鼠相比寿命更长, 平均长达 1.5 年; 移植各类外源性细胞, 较少发生排斥反应及移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD), 以及无 B 淋巴细胞泄漏现象^[23-24]。

近年来 HAART 治疗可使感染者血浆中 HIV-1 RNA 降至常规方法检测限度以下, 只有用敏感度更高的方法才可检测到病毒基因和低水平的病毒复制, 这使得 HIV RNA 检测也表现出极大的局限性, 不能检测出 HIV RNA 并不意

味着体内病毒库已被清除。本研究应用 TaqMan 荧光定量 PCR 技术定量感染小鼠组织中病毒 DNA、RNA 及整合前病毒水平, 灵敏度最低可达 1 copies/ μ L。同时 HIV 潜伏性病毒“储藏库”, 存在于静息的中枢记忆 CD4+T 淋巴细胞中。HIV 病毒感染细胞内的 HIV-1 DNA 存在形式是多样的, 包括线性非整合的、1-LTR 环状的、2-LTR 环状的和整合的, 其中整合的 HIV-1 DNA 只占总 DNA 的很少一部分(可到 4%), 然而整合 HIV 前病毒基因组具有高转录活性, 是病毒储藏库的主要存在形式, 一旦停药, 病毒会迅速反弹^[25-26]。目前较多的文献报道仅仅利用 real-time PCR 的方法来定量 HIV-1 总 DNA 并以此来判定病毒储藏库的含量, 该方法检测结果包含多种形式的 HIV-1 DNA, 因此对基因组中的 HIV“储藏库”的定量是不准确的^[27-28]。本研究建立了一种快速定量检测整合 HIV 前病毒基因组的方法, 优选引物和探针基因型, 具备覆盖率高、保守性高、特异性强等优点, 能显著区分基因组中整合的病毒 DNA 与非整合的病毒 DNA。

本研究通过尾静脉注射人 PBMCs 构建人源化小鼠嵌合模型, 并通过测定小鼠外周血中 hCD45+ 的占比来判定人源化的成熟度, 在小鼠人源化建模过程中, 建模 3-5 周后小鼠外周血 hCD45+ 细胞比例随时间持续上升, 在第 5 周时, hCD45+ 占比最高可达 83.5%, hCD4+ 和 hCD8+ 最高分别达到 8.5% 和 77.6%, 在 CD3+T 细胞群中, 有 13% 的 T 细胞同时表达 CD4+ 和 CD8+, 即双阳性(double positive, DP)表型 T 细胞, 该双阳性表型 T 细胞能否被 HIV 感染及其产生的分子机制有待进一步研究^[29-30]。通过对所有人源化小鼠的建模数据表明, 85% 小鼠外周血中 hCD45+ 占比均大于 25%, 充分说明 HuPBMC-NPG/SCID 小鼠嵌合模型具备较高的建模成功率。另外, 本研究后续会对建模注射

PBMCs 剂量及注射方式进行优化, 缩短人源化建模的时间, 同时也会通过组织中免疫荧光分析人源细胞的分布和免疫表型。随后, 本研究采用带有 NanoLuc 萤光素酶标签的实验室经典毒株 NL4-3 用于建立感染模型。在同等表达水平下, NanoLuc 萤光素酶与传统的萤火虫萤光素酶相比信号强度提高 150 倍, 这为精准定位和定量低水平 HIV 复制提供了可能^[31]。HIV 感染 16 d 后, 通过成像发现病毒首先定位在脾脏和颈部深层淋巴结及腹腔, 感染 27 d 后, 成像结果表明病毒已扩散到小鼠全身, 包括脑部。本实验不足之处在于, 应该解剖小鼠后对各个组织进行单独成像, 这样可以精准定位人源细胞在各种组织中的分布和病毒载量。实时荧光定量 PCR 技术和 nested-qPCR 技术定量结果表明, 治疗 HIV 感染的药物对于 HIV 感染的小鼠同样有效, 同时还说明小鼠体内 HIV 感染能成功整合到人源细胞的染色体中并完成转录, 结合小动物活体成像技术观察到病毒相关萤光素酶蛋白表达, 说明转录后萤光素酶基因能正常表达, 这些结果充分证明, 通过腹腔注射 HIV 病毒可成功感染该人源化 HuPBMC-NPG/SCID 小鼠模型。本研究还存在科学问题有待进一步解决, 例如, 人源化小鼠体内 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的比例为 0.42, 而在正常人免疫系统中, CD4⁺和 CD8⁺的比例在 1.4-2.5 之间。另外, CD4⁺和 CD8⁺T 双阳性细胞形成机制及能否被 HIV 感染、病毒感染是否会造成 CD4⁺T 细胞的损耗仍需进一步研究。

由于小鼠和人类的物种差异较大, 异种基因环境下人 HSCs 的发育、存活、活化和迁移分子不充分等因素导致人源化小鼠模型具有一定的局限性^[32-35]。在过去的数十年中, 新型基因工程技术用于人源化小鼠的研究进展突飞猛进, 人源化小鼠更易操作、更具有经济价值, 成为人类健康和疾病临床前期研究的重要模型系统, 未来人

源化小鼠模型将更多应用于高特异性有效的临床前期实验中, 解决人 HSCs 在小鼠体内的生物活性将是重中之重。

综上所述, 本研究利用人外周血单核细胞通过静脉注射方式植入 NPG 小鼠可成功建立人源化小鼠契合模型, 人源细胞成功在小鼠体内增殖和分化, 使不被感染小鼠转变为对 HIV-1 易感并建立稳定的感染。同时, 在整个人源化和建立病毒感染模型及抗病毒检测的实验过程中(9 周), 小鼠未出现明显 GVHD, 该模型为研究 HIV 病毒感染的免疫学机制和抗病毒治疗效果评价提供了有力工具, 特别是为开创性的抗 HIV CAR-T 免疫细胞疗法和基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的基因治疗提供动物药效评估平台^[36-39]。另外, 本研究建立的精准定量 HIV 整合前病毒的方法也为评估体内病毒库的载量大小提供了理论依据。

致谢

由衷感谢武汉科技大学分析测试中心的操媛老师在完成本研究工作的过程中对人源化建模流式测试项目的帮助。

REFERENCES

- [1] WOODRING J, ISHIKAWA N, NAGAI MR, MALARSKI M, TAKASHIMA Y, SOBEL H, LO YR. Integrating HIV, hepatitis B and syphilis screening and treatment through the Maternal, Newborn and Child Health platform to reach global elimination targets[J]. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2017, 8(4): 1-5.
- [2] BENNETT MS, JOSEPH A, NG HL, GOLDSTEIN H, YANG OO. Fine-tuning of T-cell receptor avidity to increase HIV epitope variant recognition by cytotoxic T lymphocytes[J]. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*, 2010, 24(17): 2619-2628.
- [3] AMBROSE Z, KewalRAMANI VN, BIENIASZ PD, HATZIOANNOU T. HIV/AIDS: in search of an animal model[J]. *Trends in Biotechnology*, 2007, 25(8): 333-337.
- [4] DAS AT, BERKHOUT B. Conditionally replicating HIV

- and SIV variants[J]. *Virus Research*, 2016, 216: 66-75.
- [5] 张海. 猴/人免疫缺陷嵌合病毒(SHIV)的研究进展[J]. 国外医学 病毒学分册, 2001(3): 93-96, 64.
ZHANG H. Research progress of monkey/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV)[J]. *Foreign Medical Sciences Virus Credits*, 2001(3): 93-96, 64 (in Chinese).
- [6] 吴颖运, 洪坤学, 耿运琪, 邵一鸣. SHIV 减毒株在 AIDS 疫苗研究中的应用[J]. 中国病毒学, 2004, 19(2): 187-191.
WU YY, HONG KX, GENG YQ, SHAO YM. The application of live attenuated SHIV in AIDS vaccine research[J]. *Virologica Sinica*, 2004, 19(2): 187-191 (in Chinese).
- [7] LUO MT, MU D, YANG X, LUO RH, ZHENG HY, CHEN M, GUO YQ, ZHENG YT. Tree shrew cells transduced with human CD4 and CCR5 support early steps of HIV-1 replication, but viral infectivity is restricted by APOBEC3[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(16): e0002021.
- [8] NATALINI A, SIMONETTI S, FAVARETTO G, PERUZZI G, ANTONANGELI F, SANTONI A, MUÑOZ-RUIZ M, HAYDAY A, Di ROSA F. OMP-079: cell cycle of CD4⁺ and CD8⁺ naïve/memory T cell subsets, and of Treg cells from mouse spleen[J]. *Cytometry Part A*, 2021, 99(12): 1171-1175.
- [9] LEONTYEV DS, GLAZKOVA DV, BEZBORODOVA OA, TSYGANOVA GM, URUSOV FA, PANKRATOV AA, SHIPULIN GA, BOGOSLOVSKAYA EV. Humanized mouse model of HIV infection[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2023, 175(1): 63-66.
- [10] XU YR, LI YH, CHEN SP, ZOU BH, ZHANG Q, XU M, KONG WX, SHENG HX, HU GL, LIAO L, ZHANG B, HU LD. Establishment of humanized mouse model by using transplantation of mobilized peripheral blood stem cells[J]. *Chinese Journal of Experimental Hematology*, 2015, 23(6): 1753-1757.
- [11] 郭文文, 乔天运, 张彩勤, 赵菊梅, 师长宏. 免疫系统人源化小鼠模型的构建及其在肿瘤治疗研究中的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 98-104.
GUO WW, QIAO TY, ZHANG CQ, ZHAO JM, SHI CH. Establishment of mouse models with a humanized immune system and applications for tumor immunotherapy[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2019, 29(11): 98-104 (in Chinese).
- [12] ZEISER R, BLAZAR BR. Preclinical models of acute and chronic graft-versus-host disease: how predictive are they for a successful clinical translation?[J]. *Blood*, 2016, 127(25): 3117-3126.
- [13] 汪龚泽, 刘朝奇, 杨建林, 覃晓琳, 吕佰瑞, 姚佳红. HIV-1P24 蛋白的原核表达及单克隆抗体的制备[J]. 重庆医学, 2012, 41(7): 696-698.
WANG GZ, LIU (C/Z)Q, YANG JL, QIN XL, (LÜ/LV/LU/LYU) BR, YAO JH. Prokaryotic expression of HIV-1P24 protein and preparation of monoclonal antibody[J]. *Chongqing Medicine*, 2012, 41(7): 696-698 (in Chinese).
- [14] JACOBSEN F, HIRSCH T, MITTLER D, SCHULTE M, LEHNHARDT M, DRUECKE D, HOMANN HH, STEINAU HU, STEINSTRÄESSER L. Polybrene improves transfection efficacy of recombinant replication-deficient adenovirus in cutaneous cells and burned skin[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2006, 8(2): 138-146.
- [15] POLZER S, van YPEREN M, KIRST M, SCHWALBE B, SCHAAL H, SCHREIBER M. Neutralization of X4- and R5-tropic HIV-1 NL4-3 variants by HOCl-modified serum albumins[J]. *BMC Research Notes*, 2010, 3: 155.
- [16] GU CJ, BORJABAD A, HADAS E, KELSCHENBACH J, KIM BH, CHAO W, ARANCIO O, SUH J, POLSKY B, McMILLAN J, EDAGWA B, GENDELMAN HE, POTASH MJ, VOLSKY DJ. EcoHIV infection of mice establishes latent viral reservoirs in T cells and active viral reservoirs in macrophages that are sufficient for induction of neurocognitive impairment[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(6): e1007061.
- [17] TRAMIER M, ZAHID M, MEVEL JC, MASSE MJ, COPPEY-MOISAN M. Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2006, 69(11): 933-939.
- [18] 衣京梅, 刘荷中, 唐锁勤, 贾伟. 小鼠移植植物抗宿主病模型的建立及其初步应用[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(6): 494-496.
YI JM, LIU HZ, TANG SQ, JIA W. Establishment of murine graft-versus-host disease model and its preliminary application[J]. *Medical Journal of Chinese PLA*, 2002, 27(6): 494-496 (in Chinese).
- [19] 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): 8.
HUANG H, BEN KL, ZHENG YT. Research status of animal models of human AIDS[J]. *Zoological Research*, 1997, 18(1): 8 (in Chinese).
- [20] ENGEL LA, WITTIG S, BOCK F, SAUERBIER L, SCHEID C, HOLTICK U, CHEMNITZ JM, HALLEK M, CURSIEFEN C, STEVEN P. Meibography and meibomian gland measurements in ocular graft-versus-host disease[J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2015, 50(7): 961-967.
- [21] KALOYANNIDIS P, AL SHAIBANI E, APOSTOLIDIS I, KANFAR S, AL ANEZI K, AL HASHMI H. Combination of bortezomib plus ruxolitinib in steroid-refractory chronic graft-versus-host disease[J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2019, 54: 746-748.
- [22] WENG JY, DU X, GENG SX, PENG YW, WANG Z, LU ZS, WU SJ, LUO CW, GUO R, LING W, DENG CX,

- LIAO PJ, XIANG AP. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD[J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2010, 45(12): 1732-1740.
- [23] ZHAO GJ, XU LX, CHU ESH, ZHANG N, SHEN JY, DAMIRIN A, LI XX. Establishment of an orthotopic transplantation tumor model of hepatocellular carcinoma in mice[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, 18(47): 7087-7092.
- [24] WANG L, WAN XM, GAO R, LU DF, QI ZM. Nanoporous gold films prepared by a combination of sputtering and dealloying for trace detection of benzo[a]pyrene based on surface plasmon resonance spectroscopy[J]. *Sensors*, 2017, 17(6): 1255.
- [25] RENAULT C, BOLLORÉ K, PISONI A, MOTTO-ROS C, van de PERRE P, REYNES J, TUAILLON E. Accuracy of real-time PCR and digital PCR for the monitoring of total HIV DNA under prolonged antiretroviral therapy[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 9323.
- [26] BELMONTI S, Di GIAMBENEDETTO S, LOMBARDI F. Quantification of total HIV DNA as a marker to measure viral reservoir: methods and potential implications for clinical practice[J]. *Diagnostics*, 2021, 12(1): 39.
- [27] Wu Y. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA[J]. *Retrovirology*. 2004 Jun 25;1:13.
- [28] Orlandi C, Canovari B, Bozzano F, Marras F, Pasquini Z, Barchiesi F, De Maria A, Magnani M, Casabianca A. A comparative analysis of unintegrated HIV-1 DNA measurement as a potential biomarker of the cellular reservoir in the blood of patients controlling and non-controlling viral replication[J]. *Journal of Translational Medicine*. 2020, 18(1): 204.
- [29] RUTSAERT S, de SPIEGELAERE W, van HECKE C, de SCHEERDER MA, KISELINOVA M, VERVISCH K, TRYPSTEEN W, VANDEKERCKHOVE L. In-depth validation of total HIV-1 DNA assays for quantification of various HIV-1 subtypes[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 17274.
- [30] 雷建平, 彭燕, 熊国亮, 张玉珍, 周军, 刘翼军, 邢娟娟, 李光明, 雷铭宙, 袁小亮, 涂荣耀, 涂少华. 不同时期卡介苗免疫治疗对结核病大鼠疗效和 CD4⁺CD8⁺ 双阳(DP)T 细胞的影响[J]. *中国防痨杂志*, 2006, 28(6): 404-407.
- LEI JP, PENG Y, XIONG GL, ZHANG YZ, ZHOU J, LIU YJ, XING JJ, LI GM, LEI MZ, YUAN XL, TU RY, TU SH. The different influence of BCG vaccination to the treatment effect of rats with tuberculosis and to the peripheral blood T lymphocyte subset at different period[J]. *Chinese Journal of Antituberculosis*, 2006, 28(6): 404-407, plug 1 (in Chinese).
- [31] 雷建平. CD4⁺CD8⁺双阳(DP)T 细胞与结核病及卡介苗免疫治疗相关性研究[J]. *中国科技成果*, 2009, 10(6): 58-59.
- [32] HALL MP, UNCH J, BINKOWSKI BF, VALLEY MP, BUTLER BL, WOOD MG, OTTO P, ZIMMERMAN K, VIDUGIRIS G, MACHLEIDT T, ROBERS MB, BENINK HA, EGGERS CT, SLATER MR, MEISENHEIMER PL, KLAUBERT DH, FAN F, ENCELL LP, WOOD KV. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate[J]. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7(11): 1848-1857.
- [33] CHUPRIN J, BUETTNER H, SEEDHOM MO, GREINER DL, KECK JG, ISHIKAWA F, SHULTZ LD, BREHM MA. Humanized mouse models for immuno-oncology research[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2023, 20: 192-206.
- [34] SHULTZ LD, ISHIKAWA F, GREINER DL. Humanized mice in translational biomedical research[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7: 118-130.
- [35] 陈冰, 刘昊川, 李龙云, 赵国庆, 王震, 杨永广, 李凯, 胡正. 人源化小鼠模型构建和应用的研究进展[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2018, 44(3): 667-674.
- CHEN B, LIU HC, LI LY, ZHAO GQ, WANG Z, YANG YG, LI K, HU Z. Research progress in establishment and application of humanized mouse models[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2018, 44(3): 667-674 (in Chinese).
- [36] 王萍, 陈欢, 罗荣华, 卿晨, 张高红, 郑永唐. VSVG/HIV-1_{NL4-3}Luc 假病毒筛选抗 HIV-1 药物的条件优化及应用[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(3): 433-438.
- WANG P, CHEN H, LUO RH, QING C, ZHANG GH, ZHENG YT. Optimization and application of VSVG/HIV-1_{NL4-3}Luc system for screening of anti-HIV-1 compounds[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2016, 32(3): 433-438 (in Chinese).
- [37] GARDNER R, LEGER KJ, ANNESLEY CE, SUMMERS C, RIVERS J, GUST J, TARLOCK K, COOPER TM, PINTO NR, FINNEY O, SMITHERS H, ORON A, LI D, PARK JR, JENSEN MC. Decreased rates of severe CRS seen with early intervention strategies for CD19 CAR-T cell toxicity management[J]. *Blood*, 2016, 128(22): 586.
- [38] 王幼萍, 陈利国, 吴先林. 喘可治对小鼠异基因骨髓移植中移植物抗宿主病效应的影响[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(4): 589-590.
- WANG YP, CHEN LG, WU XL. Effect of CKZ on GVHD in mouse allogeneic bone marrow transplantation[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2012, 28(4): 589-590 (in Chinese).
- [39] SHULTZ LD, ISHIKAWA F, GREINER DL. Humanized mice in translational biomedical research[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7: 118-130.

(本文责编 陈宏宇)