

## 灭活链球菌诱导的实验性慢性风湿性心瓣膜炎

谢旭晶<sup>1</sup>, 黄建林<sup>2</sup>, 冯智英<sup>3</sup>, 古洁若<sup>2\*</sup>, 余步云<sup>2</sup>

(中山大学附属第三医院 1. 心内科, 2. 风湿免疫科, 3. 病理科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】诱导慢性风湿性心瓣膜炎的动物模型,为风湿性心脏病的研究提供实验工具。【方法】Lewis 雌鼠 24 只,随机分为 A、B、C 三组,每组 8 只。抗原 D 为经 40 g/L 的多聚甲醛溶液灭活、超声处理、完全弗氏佐剂(CFA)乳化的 A 组链球菌(GAS),抗原 E 为经 40 g/L 的多聚甲醛溶液及超声处理、不加 CFA 的 GAS。A、B 组皮下注射抗原 D,每 7 d 一次,3 次后改为注射抗原 E。C 组为对照组,同样方法注射 CFA 及生理盐水。12 周后处死 A 组,24 周后处死 B、C 组。行血清抗链球菌溶血素“O”(ASO)、抗 DNA 酶 B 检查及心脏 HE 染色病理检查。【结果】ASO、抗 DNA 酶 B 检查均为阴性。A 组分别有 62.5%(5/8)及 50%(4/8)发展为心肌炎和瓣膜炎,病理表现为单个核细胞浸润。B 组分别有 75%(6/8)及 62.5%(5/8)发展为风湿性心肌炎和慢性瓣膜炎,心肌间质有 Aschoff 样细胞,瓣膜有单个核细胞、多核巨细胞浸润、成纤维细胞增生、血管新生及风湿性赘生物。C 组心肌及瓣膜均正常。【结论】采用 40 g/L 的多聚甲醛溶液灭活及超声处理的 GAS 免疫 Lewis 大鼠,处理时间至少 24 周,可诱导出与人类风湿性心脏病相似的慢性风湿性心瓣膜炎,且成功率较高。

**关键词:** A 组链球菌; Lewis 大鼠; 风湿性心瓣膜炎; 风湿性心脏病

**中图分类号:** R54      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2010)05-0692-05

### Experimental Chronic Rheumatic Valvulitis Induced by Inactive Streptococci

XIE Xu-jing<sup>1</sup>, HUANG Jian-lin<sup>2</sup>, FENG Zhi-ying<sup>3</sup>, GU Jie-ruo<sup>2\*</sup>, YU Bu-yun<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Rheumatology, 3. Department of Pathology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】To induce an animal model of chronic rheumatic valvulitis for further investigation and prevention of rheumatic heart disease. 【Method】Twenty-four female Lewis rats were randomly divided into three groups: A, B and C, 8 rats per group. Antigen D was mixture of formalin-killed, sonicated group A and Complete Freund's Adjuvant (CFA). Antigen E was formalin-killed and sonicated group A streptococci without CFA. Rats in group A and B were immunized by antigen D every 7 days, after 3 cycles followed by antigen E. Rats in group C were administered adjuvants and saline in same method. Rats in group A were killed 12 weeks after the initial injection. Rats in group B and C were sacrificed 24 weeks after the initial injection. Serum antistreptolysin-O (ASO) and anti-deoxyribonuclease B (anti-DNase B) of all animals were tested. Heart section were stained with hematoxylin and eosin for microscopic histological examination. 【Result】Serum ASO and anti-DNase B of all animals were negative. Five and four of rats in group A developed myocarditis and valvulitis respectively. Examination of cardiac sections showed that only mononuclear cell infiltrates were present. Six and five of rats in group B developed rheumatic-like myocarditis and chronic valvulitis respectively. Histological manifestations of group B not only involved acute damage such as cellular infiltrates, Aschoff-like cells, verrucous vegetation, but also chronic lesions such as fibrosis, vascular neogenesis. None of rats in group C presented myocarditis or valvulitis. 【Conclusion】Lewis rats immunized by formalin-killed and sonicated group A streptococci for at least 24 weeks duration developed chronic rheumatic valvulitis which histological manifestations were similar to those seen in human RHD. Successful probability of this method to induce chronic rheumatic valvulitis was relatively high.

**Key words:** Group A streptococcus; Lewis rat; rheumatic valvulitis; rheumatic heart disease

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2010, 31(5): 692-696]

收稿日期: 2010-02-05

基金项目: 广东省科技计划项目(2005A20801005)

作者简介: 谢旭晶, 博士, 主治医师, 研究方向: 风湿热与风湿性心脏病, E-mail: xujing\_xie@yahoo.com.cn; \* 通信作者: 古洁若, 教授, E-mail: gujieruo@163.com

急性风湿热(acute rheumatic fever, ARF)是A组链球菌(group A streptococcus, GAS)感染诱发的一种迟发性免疫反应,累及心瓣膜可引起瓣膜不可逆狭窄和/或关闭不全,即风湿性心脏病(rheumatic heart disease, RHD),是ARF致死致残的最主要原因。RHD的发病机制尚不完全清楚,但是GAS在RHD发病中的关键作用已经明确。目前较普遍的观点认为GAS的某些组分与宿主心脏之间的分子模拟打破了宿主对自身抗原的免疫耐受而致病。已知链球菌M蛋白与心肌的肌球蛋白、层粘连蛋白分子结构非常相似<sup>[1-2]</sup>。动物模型的建立对进一步探明其发病机制及开发新的治疗策略意义重大。然而模型的建立多年来一直是个难题。瓣膜炎是风湿热最严重的并发症,但是近50年来未见有关风湿性瓣膜炎动物模型的成功报道,至今尚无一种成熟的动物模型的病理改变与人类的相似<sup>[3]</sup>。我们以往的研究证实了甲醛溶液灭活GAS诱导风湿性心肌炎的可行性<sup>[4-5]</sup>。本研究旨在采用甲醛溶液灭活的GAS诱导实验性慢性风湿性心瓣膜炎。

## 1 材料与方法

### 1.1 细菌培养、灭活及抗原制备

复苏A组 $\beta$ 溶血性链球菌标准菌株,接种到羊血平皿上,37℃培养24h,见细菌生长良好,溶血环明显,刮取菌落接种至3L脑心浸液(Biomerieux,法国)中,37℃快速振荡培养24h,3500 r/min( $r = 10$  cm)离心收获细菌,收获细菌的湿质量约为7g。灭菌生理盐水洗涤3次,于50 mL 40 g/L的多聚甲醛溶液中浸泡6h,洗涤5次。挑取处理后细菌接种于羊血平皿培养,24h后观察无细菌生长。将GAS溶解于生理盐水中,终浓度调整至520 nm波长下光密度为2.5,置于冰中超声破碎(8 W  $\times$  10 min, 10 mL),最后用弗氏完全佐剂以1:1体积比将细菌悬液充分乳化,制备成抗原D。经以上处理但未加弗氏完全佐剂的GAS混悬液为抗原E。

### 1.2 实验动物

7周龄Lewis雌鼠24只,体质量150~190g,购买自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物在中山大学动物SPF(Specific Pathogen Free, SPF)级实验中心饲养。

### 1.3 瓣膜炎诱导方法

动物随机分成A、B、C三组,每组8只。A组、B组于后足足垫注射0.2 mL抗原D(第0天),第7天、第14天于腹部皮下注射0.5 mL抗原D。C组采用同样方法注射生理盐水与弗氏完全佐剂的混合液。自第21天始,A、B组于腹部皮下注射0.5 mL抗原E,每7 d 1次。C组采用同样方法皮下注射生理盐水。

### 1.4 实验室检查

动物予以50 mL/L水合氯醛腹腔内注射,剂量为6~8 mL/kg,5 min内达到满意的麻醉效果。动物麻醉后,沿剑突及肋弓下缘剪开腹腔,再沿胸侧壁向上剪开胸腔,掀起整个胸壁,即可充分暴露心脏,用5 mL注射器直接穿刺心脏,回抽得到约4至5 mL血。离心后得到血清测ASO和抗DNA酶B。ASO测定采用胶乳凝集法,试剂购自上海捷门生物技术合作公司。抗DNA酶B测定用微量法,试剂购自广东省心血管研究所风湿热实验室,检验过程严格按照说明书的操作步骤进行。

### 1.5 心脏的组织学检查

大鼠麻醉后切取心脏,置于40 g/L多聚甲醛溶液中浸泡过夜,石蜡包埋,切成5  $\mu$ m厚薄,HE染色,显微镜观察。

## 2 结果

### 2.1 实验室检查

所有大鼠血清ASO及抗DNA酶B均为阴性。

### 2.2 心脏组织的病理变化

心肌组织病理检查显示A、B两组各有62.5%(5/8)及75%(6/8)出现心肌间质水肿,血管周围细胞浸润(图1A及表1)。B组放大观察倍数后发现小血管附近有的Aschoff样细胞(图1B),横切面上像“毛毛虫”。同时观察到B组大鼠心肌的血管发生了血管炎,镜下表现为血管壁单个核细胞浸润及内皮增生(图1C)。A组未见Aschoff样细胞。

大鼠的心瓣膜很小,所以几乎不可能在同一只动物中看到所有的心瓣膜。鉴于二尖瓣在RHD中的重要地位,因此二尖瓣是取材时首要考虑的因素。所有大鼠均能看到二尖瓣。A、B两组中各有50%(4/8)及62.5%(5/8)发生瓣膜炎(表1),然而两组的病理变化有很大差别。A组瓣膜炎的改变

仅表现为瓣膜水肿、黏液样变性、细胞浸润(图 2A, B)。而 B 组中同一只大鼠既有急性损害,也有慢性病理损害,表现为淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞、多核巨细胞为主的细胞浸润,瓣膜增厚,基底部少量细胞浸润,肿胀的纤维母细胞和 Anischkow 细胞呈栅栏状排列。成纤维细胞垂直于瓣膜边缘增生,瓣膜闭合缘出形成由血小板和纤维素组成的疣状赘生物,新生血管(图 2C-F)。

C 组的心肌及瓣膜结构正常,无一例发生心肌炎和/或瓣膜炎(图 1D,图 2G-H)。

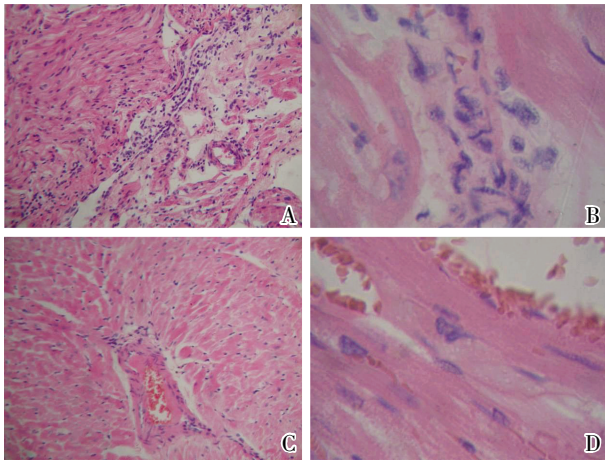


图 1 甲醛溶液灭活 GAS 诱导 Lewis 大鼠心肌炎的病理特点

Fig.1 Histological features of myocarditis histological features of myocarditis

A: Myocarditis; intense mononuclear cells infiltrate. B: Group 2; Aschoff-like cells near vessel, like caterpillar. C: Vasculitis; cells filtrate in vessel wall, endothelium hyperplasia. D: Control group; normal myocardial tissue. HE staining, Orginal magnification  $\times 200$  (left) or  $\times 400$  (right)

表 1 三组 Lewis 大鼠心肌炎及瓣膜炎发生率

Table 1 Myocarditis and valvulitis in Lewis rats immunized with formalin-killed GAS

Group	No. of rats with/No. tested	
	Myocarditis	Valvulitis
Group 1 <sup>1)</sup>	5/8	4/8
Group 2 <sup>2)</sup>	6/8	5/8
Control <sup>3)</sup>	0/8	0/8

1) immunized with formalin-killed GAS emulsified in CFA and sacrificed on week 12. 2) immunized with formalin-killed GAS emulsified in CFA and sacrificed on week 24. 3) immunized with CFA and saline, and killed on week 24.

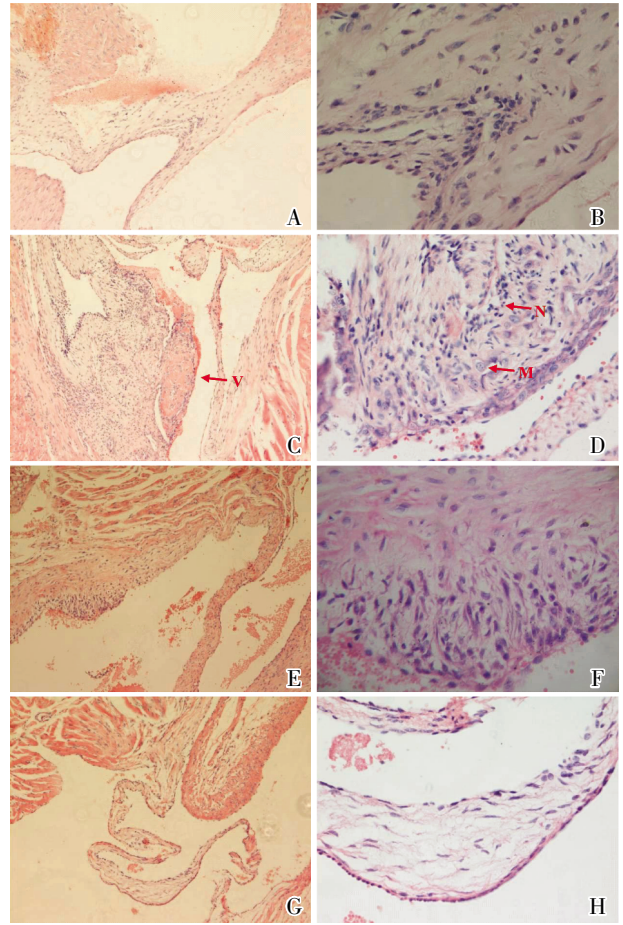


图 2 甲醛溶液灭活 GAS 诱导 Lewis 大鼠二尖瓣瓣膜炎的病理表现

Fig.2 Valvulitis in mitral valves from Lewis rats immunized with formalin-killed GAS

A, B: Group 1, mononuclear cells infiltrate of valve. C: Group 2, verrucous vegetation on the surface of valve, valve thickening, swelling, vascular neogenesis, and cellular infiltrates. D: Group 2, cellular infiltrates composed primarily of lymphocytes, macrophages, and multinucleated giant cells. E, F: Valve swelling, fibroblast proliferating perpendicularly to valvular edge. G, H: Normal structure of valve of control group. V: verrucous vegetation; M: multinucleated giant cell; N: neogenesis; HE staining, Orginal magnification  $\times 100$  (left) or  $\times 400$  (right)

### 3 讨 论

GAS 与风湿热和风湿性心脏病之间的联系已经非常明确。GAS 除分泌酶和毒素等多种胞外产物,具有复杂抗原性的菌体结构本身可以通过免疫机制介导对宿主的损害。菌体成分包括荚膜、细胞壁和细胞膜<sup>[6]</sup>。本研究中链球菌经过甲醛溶液及超声处理,细菌失活,不产生溶血素“O”及 DNA

酶等胞外产物,所以实验组所有动物的血清抗“O”、抗DNA酶B均为阴性。但是灭活细菌的细胞壁及胞膜的抗原仍保留,仍能激发宿主的免疫反应而造成免疫损伤。临床上有一部分进行瓣膜置换术的风湿性心脏病患者,临床诊断为风湿活动静止期,提示链球菌感染和活动性炎症的指标,如抗“O”、抗DNA酶B、血沉、C反应蛋白均为正常,但是心脏病理检查显示仍有大量纤维素样坏死、Aschoff小体等明显的风湿活动存在,瓣膜炎呈隐匿性<sup>[7-9]</sup>。本实验结果与临床上这些患者血清抗“O”、抗DNA酶B阴性,但心脏病理有活动性炎症相一致。这同时说明目前临床上常用的几项指标对这类患者的价值不大。因此有关学者呼吁,有必要积极研究,引入更加敏感、特异的检测方法。

典型风湿性心脏病的病理过程大致可分为3期:变性渗出期、增殖期和硬化期。前二者属于急性期损害。急性期的特征是心肌间质的Aschoff小体。瓣膜受累时,闭合缘可出现风湿性赘生物。硬化期表现为纤维化,新生血管。反复链球菌感染时,急、慢性病理变化可同时存在。国内外学者们一直在努力地建立风湿性心脏病的动物模型,但是至今无标准化的模型,极少病理变化符合典型Aschoff小体的特点<sup>[10-12]</sup>。余步云<sup>[13]</sup>采用家兔多次结膜下注射GAS活菌,24周后,18只家兔中有4只发生了风湿性心脏病,其中1只心肌间质出现类似Aschoff小体,1只二尖瓣发生纤维素样坏死及风湿性赘生物形成,另2只瓣膜出现黏液样变性。该法注射方法较难掌握,成功率不高。宋智刚等<sup>[14]</sup>报道采用62只家兔反复静脉注射GAS,感染后青霉素肌肉注射,9例出现Aschoff小体,发生于感染结束后第18周~18月。5例有风湿性赘生物。这种诱导方法动物出现典型病变的时间差异大,且死亡率高(14/62)。Cunningham MW工作组<sup>[10]</sup>通过皮下注射链球菌重组M6蛋白免疫Lewis大鼠,17d后50%(3/6)发生心肌炎及瓣膜炎,病理表现为单个核细胞浸润、瓣膜表面疣状结节形成。并观察到了Anitschkow细胞及“毛毛虫”样细胞。进一步采用人和大鼠的心肌肌浆球蛋白不同抗原决定簇免疫Lewis大鼠,21d后,两组分别有43%(10/23)及46%(6/23)发生瓣膜炎,病理特点为单个核细胞浸润。心肌及瓣膜未见Aschoff小体。可能是诱导时间短,未见纤维化及血

管新生<sup>[11]</sup>。Cunningham MW工作组的动物模型证实了M蛋白在诱发实验性风湿性心脏病中的重要作用,但病理改变不同与人类RHD,结果提示不应忽略GAS的其他抗原成分的致病作用。

本研究采用的抗原包括细胞壁及细胞膜的成分,如蛋白、多糖、肽聚糖。我们既往研究已证实了甲醛溶液灭活GAS诱导风湿性心肌炎的可行性<sup>[4-5]</sup>,并在本研究中重复出心脏病渗出期的病变,而且在B组动物的心肌间质中观察到类似Aschoff小体,瓣膜有大量单核细胞、多核巨细胞浸润,同时有成纤维细胞增生,血管新生。本研究最有趣的现象就是B组中二尖瓣急性和慢性的病理改变共存于同一只动物,可能是因为反复多次注射抗原,不断产生新的病变,而旧的病变逐渐慢性化。这和人类风湿性心脏病风湿活动的病理很相似。A、B两组不同之处是观察时间和刺激次数,A组观察时间为12周,接受抗原刺激共12次。B组观察时间为24周,接受抗原刺激共24次。结果提示,除了抗原种类,处理时间对风湿性心瓣膜炎的发生也非常重要,12周尚不足以发生慢性损害。至今我们未见到关于慢性心瓣膜炎动物模型报道。血管新生和纤维化是标志炎症慢性化的病理表现。正常瓣膜是无血管组织,血管新生利于淋巴细胞大量侵入,使炎症持续且不断加重。纤维化可导致瓣膜失功能,更重要的是,它也是许多不同病因的瓣膜疾病最终经历的病理过程。因此在早期减少瓣膜组织血管新生及纤维化可能为防治随后的病变过程提供新的治疗靶点。本研究诱导的Lewis大鼠实验性慢性瓣膜炎与人类的相似,且具有可操作性强、经济、安全等优点,为风湿性心脏病发病机制的深入研究,以及瓣膜血管新生、纤维化的早期防治都提供一个非常适用的工具。相对长的诱导周期及多次反复GAS抗原刺激可能是成功诱导风湿性心脏病慢性期病变的关键。

综上所述,我们的初步研究提示,采用甲醛溶液灭活及超声处理的GAS作为抗原,诱导时间相对延长免疫Lewis大鼠,该法可诱导较典型的实验性慢性风湿性心瓣膜炎。

#### 参考文献:

- [1] Veasy LG, Hill HR. Immunologic and clinical correlations in rheumatic fever and rheumatic heart disease [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 1997, 16(4): 400-407.

- [2] Cunningham MW. Autoimmunity and molecular mimicry in the pathogenesis of post-streptococcal heart disease [J]. *Front Biosci*, 2003, 8: s533-s543.
- [3] Gorton D, Govan B, Olive C, et al. A role for an animal model in determining the immune mechanisms involved in the pathogenesis of rheumatic heart disease [J]. *International Congress Series*, 2006, 1289: 289-292.
- [4] Huang J, Xie X, Lin ZF, et al. Induction of myocarditis lesions in Lewis rats by formalin-killed cells of group A streptococcus [J]. *J Int Med Res*, 2009, 37(1): 175-181.
- [5] 黄建林,冯智英,谢旭晶,等. 灭活 A 组链球菌全菌体抗原诱导风湿性心脏炎的可行性 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2009, 30(1): 51-55.
- [6] 余步云. 风湿热与风湿性心脏病 [M]. 广州: 广东科技出版社, 2007: 3-16.
- [7] Elster SK, Wood HF. Studies of C-reactive protein in patients with rheumatic heart disease I: Lack of correlation between C-reactive protein and Aschoff bodies in left auricular appendage biopsies [J]. *Am Heart J*, 1955, 50(5): 706-714.
- [8] McNeely WF, Ellis LB, Harken DE. Rheumatic "activity" as judged by the presence of Aschoff bodies in auricular appendages of patients with mitral stenosis II: Clinical aspects [J]. *Circulation*, 1953, 8: 337-344.
- [9] Tedeschi CG, Wagner BM, Pani KC. Studies in rheumatic fever I: The clinical significance of the Aschoff body based on morphologic observations [J]. *AMA Arch Pathol*, 1955, 60(4): 408-422.
- [10] Quinn A, Kosanke S, Fischetti VA, et al. Induction of autoimmune valvular heart disease by recombinant streptococcal M protein [J]. *Infect Immun*, 2001, 69(6): 4072-4078.
- [11] Galvin JE, Hemric ME, Kosanke SD, et al. Induction of myocarditis and valvulitis in Lewis rats by different epitopes of cardiac myosin and its implications in rheumatic carditis [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(1): 297-306.
- [12] Lymbury RS, Olive C, Powell KA, et al. Induction of autoimmune valvulitis in Lewis rats following immunization with peptides from the conserved region of group A streptococcal M protein [J]. *J Autoimmun*, 2003, 20(3): 211-217.
- [13] 余步云. 链球菌眼结膜下注射诱发家兔风湿性心脏炎的初步报告 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 1983, 4(1): 68-75.
- [14] 宋智钢,刘维永,晏培松,等. 实验性风湿性心脏炎动物模型的建立 [J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23(20): 1853-1856.

(编辑 刘清海)

.....

(上接第 684 页 from page 684)

## 参考文献:

- [1] 孙阳,董文翔,刘芳,等. 脑卒中患者的睡眠障碍及其相关因素分析 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2007, 33(12): 744-746.
- [2] 周际. 卒中患者睡眠障碍特点及影响因素分析 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2005, 2(4): 173-174.
- [3] 中华神经学会. 各类脑血管疾病诊断要点 [J]. *中华神经科杂志*, 1996, 29(6): 379-380.
- [4] 刘贤臣,唐茂芹,胡蕾,等. 匹兹堡睡眠质量指数的信度和效度研究 [J]. *中华精神科杂志*, 1996, 29(2): 103-107.
- [5] Duncan PW, Jorgensen HS, Wade DT. Outcome measures in acute stroke trials: a systematic review and some recommendation to improve practice [J]. *Stroke*, 2000, 31(6): 1429-1438.
- [6] Goldstein LB, Bertels C, Davis JN. Interrater reliability of the NIH stroke scales [J]. *Arch Neurol*, 1989, 46(6): 660-662.
- [7] Hermann DM, Bassetti CL. Sleep-related breathing and sleep-wake disturbances in ischemic stroke [J]. *Neurology*, 2009, 73(16): 1313-1322.
- [8] Rittman M, Hinojosa MS, Findley K. Subjective sleep, burden, depression, and general health among caregivers of veterans poststroke [J]. *J Neurosci Nurs*, 2009, 41(1): 39-52.
- [9] 刘中霖,王丽敏,刘军,等. 短程奥氮平联合氟西汀治疗卒中后抑郁 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(3S): 209-211.
- [10] Xi Z, Luning W. REM sleep behavior disorder in a patient with pontine stroke [J]. *Sleep Med*, 2009, 10(1): 143-146.
- [11] Kim CR, Chun MH, Han EY. Effects of hypnotics on sleep patterns and functional recovery of patients with subacute stroke [J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2010, 89(4): 315-322.
- [12] Sterr A, Herron K, Dijk DJ, et al. Time to wake-up: sleep problems and daytime sleepiness in long-term stroke survivors [J]. *Brain Inj*, 2008, 22(7-8): 575-579.

(编辑 刘清海)