

灭活 A 组链球菌全菌体抗原诱导风湿性心脏炎的可行性

黄建林¹, 冯智英², 谢旭晶¹, 余步云¹, 古洁若¹
(中山大学附属第三医院 1. 风湿免疫科, 2. 病理科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨以 Lewis 大鼠为实验对象,用皮下注射灭活 A 组链球菌全菌体抗原的方法诱导风湿性心脏炎的可行性。【方法】复活并繁殖 A 组 β 溶血性链球菌,细菌用 40 g/L 甲醛液灭活。实验大鼠分为 3 组:对照组(4 只)、模型 A 组(8 只)、模型 B 组(5 只)。模型 A 组大鼠后足垫注射灭活 A 组链球菌全菌体抗原/完全弗氏佐剂(CFA)混合液。初次免疫后第 1 周腹部皮下再次注射上述抗原 1 次,第 3 周(第 21 天)解剖动物。模型 B 组大鼠初次免疫同模型 A 组,第 1、2、3 周腹部皮下重复接受注射上述抗原,第 6 周(第 42 天)解剖动物。对照组大鼠后足垫注射生理盐水/CFA 混合液,第 3 周(第 21 天)解剖动物。观察动物的体质量、足关节炎程度、抗心肌抗体 IgG 吸光度,以及心脏、肾脏、肺脏和足关节的病理组织切片。【结果】模型 A 组大鼠的抗心肌抗体 IgG 吸光度免疫前、免疫后第 2 周、第 3 周分别为 0.13($S = 0.03$)、0.24($S = 0.06$)和 0.27($S = 0.03$),提示 HRAb IgG 抗体浓度从免疫后第 2 周开始呈上升趋势。免疫后第 3 周,模型 A 组 8 只大鼠中有 3 只心肌间质出现少量的灶性炎症细胞浸润,未观察到心瓣膜炎症变化。模型 B 组大鼠 5 只大鼠中有 4 只心肌间质小血管旁出现较明显的灶性炎症细胞浸润,其中 2 只观察到心瓣膜炎症。【结论】以 Lewis 大鼠为对象,使用皮下注射灭活 A 组链球菌的方法,可以诱发大鼠发生心脏炎。

关键词: 风湿热; 动物模型; 酿脓性链球菌

中图分类号: R593.21

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)01-0051-05

Feasibility of Rheumatic Carditis Induced by Inactivated Whole Cell Antigen of Group A Streptococcus

HUANG Jian-lin¹, FENG Zhi-ying², XIE Xu-jing¹, YU Bu-yun¹, GU Jie-ruo¹

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

Abstract: 【Objective】 To investigate the feasibility of rheumatic carditis in Lewis rats induced by formalin-inactivated whole cell antigen of group A streptococcus (GAS) by subcutaneous injection. 【Methods】 GAS were cultured in liquid media of heart-brain infusion and inactivated by 10% formalin. Seventeen Lewis rats were divided into control group (4 Lewis rats), model A group (8 Lewis rats), and model B group (5 Lewis rats). Lewis rats in model A group were injected in post-foot pads with the mixed solution of formalin-inactivated GAS suspension and complete Freund's adjuvant (CFA) (0.2 mL per rat), repeated subcutaneous immunization was done in rat bellies after 1 week, and they were sacrificed 3 weeks after the initial immunization. Model B group received initial immunization, as model A group, with repeated subcutaneous immunization in their bellies after 1, 2, and 3 weeks, and they were sacrificed 6 weeks after the initial immunization. Control group was dealt with the emulsification of normal saline blended with CFA as model A group. Body weight, podarthritis, absorbance of anti-myocardial antibody (IgG) and pathological changes of heart, kidney, lung, and podarthrum were observed. 【Results】 Absorbencies of anti-myocardial antibody (IgG) in model A group rats were 0.13 ($S = 0.03$), 0.24 ($S = 0.06$), and 0.27 ($S = 0.03$) before immunization and in the 2nd and 3rd week after the initial immunization, respectively, which suggested increasing of concentration of heart reactive antibody IgG (HRAb IgG) detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the 2nd week after immunization. Focal inflammatory cell infiltration was observed in myocardial interstitial in 3 of 8 rats in model A group. In model B group, more focal

收稿日期:2008-05-26

基金项目:广东省自然科学基金(5001793)

作者简介:黄建林,博士,硕士生导师,副主任医师,E-mail:jianlin_h@163.com

inflammatory cell infiltration was presented in 4 rats and valvulitis was observed in 2 rats. [Conclusion] Carditis might be induced by immunization of formalin-inactivated GAS in Lewis rats.

Key words: rheumatic fever; animal model; *Streptococcus pyogenes*

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(1): 51-55]

风湿热(rheumatic fever, RF)是A组 β 溶血性链球菌(以下简称“A组链球菌”)感染咽喉部后引起的一种自身免疫性疾病,可累及全身多个系统。其主要危害在于长期、反复发作的风湿性心瓣膜炎可导致慢性心瓣膜损害,形成风湿性心脏病(rheumatic heart disease)^[1]。A组链球菌作为RF的病因已经非常明确。然而,风湿热的发病机制比较复杂,涉及体液免疫、细胞免疫、遗传易感性、病原体和环境因素的等多方面因素,具体发病机制尚不清楚^[2]。然而目前尚无理想的风湿热动物模型供医学研究使用。本研究目的在于探讨以Lewis大鼠为实验对象,用皮下注射灭活A组链球菌全菌体抗原的方法诱导风湿性心脏炎的可行性,为进一步开展风湿性心脏炎发病机制和免疫炎症调控机制的研究提供平台。

1 材料与方 法

1.1 实验对象

Lewis大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号为SCXK(京)2002-0003)。均为雌性,7周龄时用于实验,体质量152~173 g。

1.2 主要试剂

完全弗氏佐剂购自Sigma公司。抗大鼠心肌抗体(IgG)ELISA试剂盒购自USCN Life Science & Technology Company。

1.3 抗原制备

①制备灭活的A组链球菌全菌体抗原:复活本实验室保存的A组链球菌(该株细菌系从风湿热患者咽喉部分离出,并经美国亚特兰大疾病控制中心鉴定^[3]),于心脑浸液的液体培养基中繁殖,24 h后收获细菌。离心细菌悬液,细菌沉淀加入40 g/L的甲醛溶液,灭活12 h^[4-5]。用无菌生理盐水洗5次,离心后的沉淀即为灭活的A组链球菌全菌体抗原;②配制目标浓度的全菌体抗原悬液:上述灭活链球菌用灭菌生理盐水悬浮,细菌配制成浓度为 1.2×10^{11} 菌落形成单位(colony forming unit, CFU)/mL悬液。细菌浓度计算方法:

比色吸光度为X,细菌总数($\times 10^8$ CFU/mL)Y = $51.102X - 3.931$ ^[6];③配制灭活链球菌全菌体抗原/完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)混合液:在无菌条件下,灭活链球菌全菌体抗原悬液和CFA按体积比1:1比例混合,摇匀,分装,置4℃冰箱备用,作为模型组大鼠注射用的抗原;④配制生理盐水/CFA混合液:在无菌条件下,生理盐水和CFA按体积比1:1比例混合,摇匀,分装,置4℃冰箱备用,作为对照组大鼠注射用的抗原。

1.4 实验动物分组和免疫方法

实验分两批次进行。第一次实验,新购买的12大鼠按从饲养笼中随机取出的顺序,分为2组:①对照组:4只,后足垫(掌面皮下)注射生理盐水/CFA混合液,每鼠0.2 mL。初次免疫后1周,腹部皮下再次注射1次,量同前;饲养至第3周时解剖动物;②模型A组:8只,后足垫(掌面皮下)注射灭活链球菌全菌体抗原/CFA混合液:每鼠0.2 mL。初次免疫后1周,腹部皮下再次注射1次,量同前;饲养至第3周末时,用戊巴比妥(30 g/L)腹腔注射麻醉大鼠后解剖动物。

在第一批次实验结束后,进行了第二批次实验——模型B组实验。因第一次实验未发现对照组大鼠发生心脏炎改变,故模型B组未设立对照组。模型B组设实验大鼠5只,初次免疫方法同模型A组,初次免疫后第1、2、3周时腹部皮下再次注射上述抗原,量同前,饲养至第6周时解剖动物,麻醉方法同前述。

委托中山大学实验动物中心(许可证号:SYXK(粤)2007-0081),在清洁级环境下饲养动物。

1.5 观察内容

观察动物的体质量、后足关节炎症程度。分别于免疫前、初次免疫后第1和第2周,用乙醚麻醉大鼠后从眼球后静脉丛取血标本。用戊巴比妥麻醉动物后解剖动物,心脏取血,取心脏、肾脏、肺脏、前足和后足关节,用甲醛溶液进行固定,按常规方法进行石蜡切片和苏木素伊红(HE)染色,观

察病理改变。血标本检测抗心肌抗体(IgG)吸光度变化。

1.6 统计学方法

计量资料用均数($S =$ 标准差)表示。两个独立样本均数比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。统计软件使用 SPSS11.0。

2 结果

2.1 大鼠体质量变化

免疫前模型 A 组和对照组大鼠体质量差别无统计学意义。免疫后第 2 周对照组大鼠体质量为 173.3($S = 6.7$)g, 模型 A 组大鼠体质量为 159.0($S = 7.4$)g。免疫后第 3 周对照组大鼠体质量为 195.2($S = 5.5$)g, 模型 A 组大鼠体质量 181.0($S = 5.2$)g, 提示注射链球菌全菌体抗原可影响大鼠的体质量增长($t = 4.37, P = 0.001$)。模型 B 组大鼠质量在免疫前、初次免疫后第 2 周、第 4、第 6 周分别为 157.2($S = 9.9$)、160.2($S = 17.2$)、149.8($S = 13.1$)和 168.2($S = 26.7$)g。

2.2 血清抗心肌抗体 IgG 滴度变化

按试剂盒说明书的实验方案,用 ELISA 法检测抗心肌抗体-IgG (heart reactive antibody IgG, HRAb-IgG)。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(A),用 A 值大小代表 HRAb-IgG 浓度。结果显示,模型 A 组大鼠免疫前 $A = 0.13(S = 0.03)$,免疫后 2 周 $A = 0.24(S = 0.06)$,免疫后 3 周 $A = 0.27(S = 0.03)$ 。提示 HRAb IgG 抗体浓度从免疫后第 2 周开始呈上升趋势。

2.3 关节炎

首次注射抗原后第 1 天,模型 A 组和 B 组的大鼠后足注射部位出现明显的红、肿、热,肿胀至解剖动物时未消失,第 3 天起可观察到非注射侧足部亦出现关节红、肿、热,程度较注射侧轻,模型 A 组大鼠至第 3 周时肿胀开始减轻。模型 A 组和 B 组大鼠后足关节病理切片发现双侧后足关节周围组织可见炎症细胞浸润。首次免疫后第 1 天,对照组大鼠注射侧有轻度的肿胀,非注射侧足部无关节红、肿、热;注射侧足部局部红、肿、热现象约于 1 周后消失,后足关节病理切片未发现炎症细胞浸润(图 1A-D)。

2.4 心脏炎

免疫后第 3 周,模型 A 组 8 只大鼠中有 3 只

心脏出现灶性炎症细胞浸润(图 1E-F),未发现瓣膜炎症。对照组大鼠心肌未发现灶性炎症细胞浸润及瓣膜炎症(图 1G-H)。免疫后第 6 周,模型 B 组 5 只大鼠中有 4 只大鼠心肌间质小血管旁出现较明显的灶性炎症细胞浸润(图 1I-J),其中 2 只发现瓣膜炎症细胞浸润(图 1K-L)。均未发现典型的阿孝夫小体、黏液样变性和纤维素样变性。

2.5 肾脏和肺脏

模型组和对对照组大鼠的肾脏、肺脏组织切片未发现有意义的病理变化。

3 讨论

实验性风湿性心脏炎的研究,对进一步研究风湿热的发病机制和探索新的治疗方法具有重要意义。然而,至目前为止,由于典型的风湿性心脏炎的病理改变发生率较低^[7-10],风湿热动物模型的制作仍有待进一步研究和完善。Lewis 大鼠品系具有可诱发自身免疫心脏炎、过敏性脑脊炎和过敏性鼻炎的特征。Quinn 等^[11]研究提示 Lewis 大鼠是研究风湿性和自身免疫介导的瓣膜性心脏病的一种具有巨大潜力的新工具,然而该研究使用了灭活的百日咳杆菌作为增加免疫反应的重要抗原,该菌在中国市场目前不能获得;免疫用的抗原是重组 M 蛋白多肽,而链球菌 M 蛋白只是 A 组链球菌致病抗原中的一种,A 组链球菌其它抗原,如多糖抗原、膜蛋白抗原,亦参与了人类 RF 的发病^[12]。故该模型用于人类 RF 的研究可能有一定的局限性。

本研究发现,皮下注射灭活链球菌全菌体抗原可诱发 Lewis 大鼠发生非化脓性关节炎。注射链球菌抗原和佐剂后,非注射侧足的关节周围发生红肿。观察至第 3 周,非注射侧关节炎可逐渐减退。第 3 周时解剖模型 A 组大鼠,后足病理切片提示非注射侧足关节周围组织有炎症细胞浸润。而对照组未发现上述病理改变。提示非注射侧的足关节及其周围发生的炎症与链球菌抗原的刺激有关。

本研究最重要的发现在于研究提示皮下注射灭活链球菌全菌体抗原可诱导 Lewis 大鼠发生心脏炎。本研究设 A、B 两个模型组,旨在观察注射链球菌抗原后的不同时间点大鼠心脏病理改变的差别。研究结果显示,注射抗原后第 3 周,心肌间

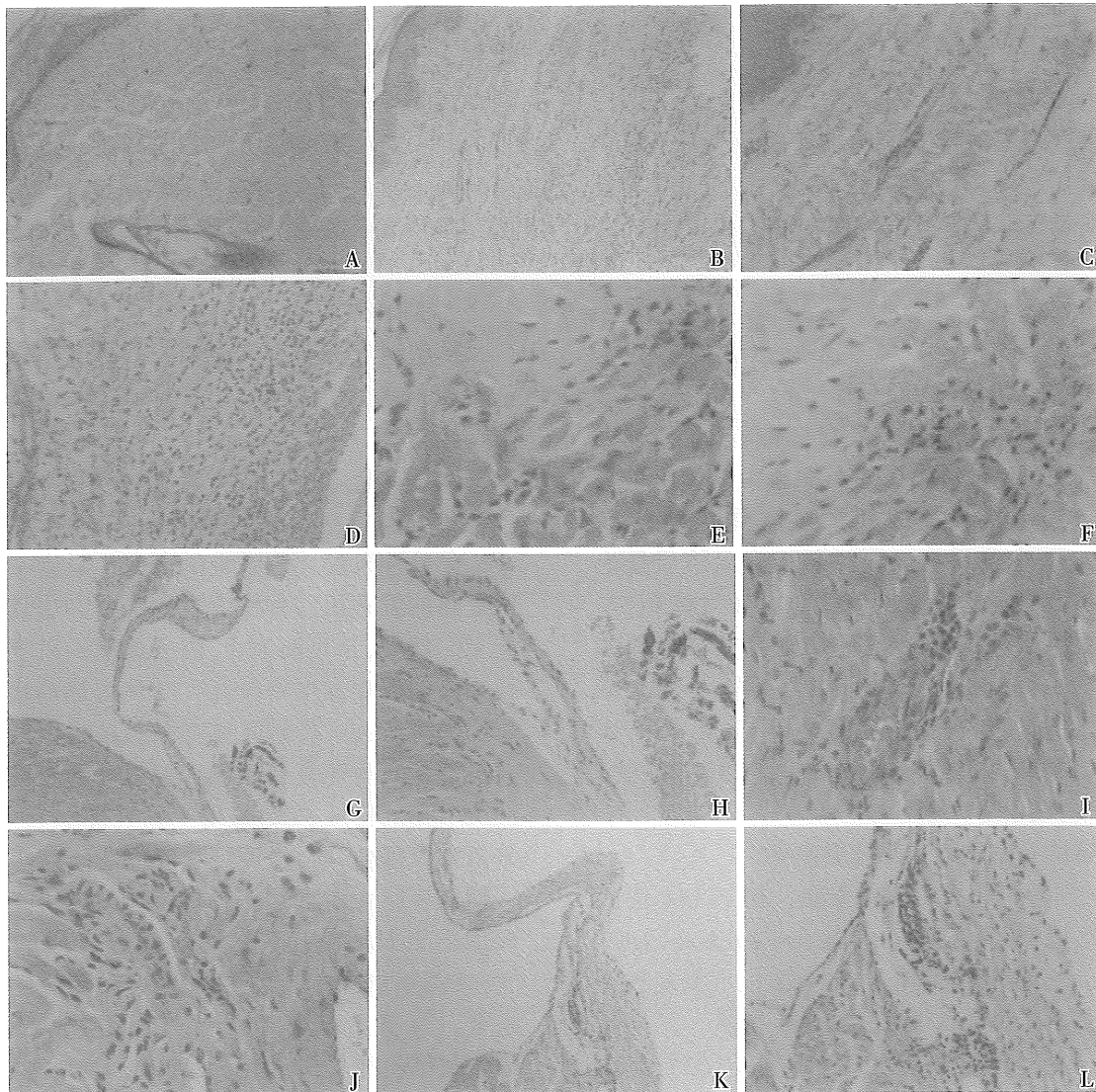


图 1 实验大鼠后足及心脏病理组织切片

Fig.1 Tissue sections of postpedes and heart from experimental rats

A, B: tissues around of the injected postpedes of Lewis rats of control and model groups in 3 weeks after the initial immunization, $\times 40$; C, D: tissues around of the non-injected postpedes of Lewis rats of control group and model group A in 3 weeks after the initial immunization, $\times 40$; E, F: heart tissue pathological sections of rats in model group A show focal inflammatory cells infiltration in interstitial tissues in 3 weeks after the initial immunization, $\times 200$; G, H: valve of rats in control group, $\times 100$ and $\times 200$ respectively; I, J: heart tissue pathological sections of rats in model group B in 6 weeks after the initial immunization, $\times 200$; K, L: valve of rats in 6 weeks after the initial immunization in model group B, $\times 100$ and $\times 200$ respectively; HE staining

质及血管旁有少量的炎症细胞渗出及浸润。随着免疫时间的延长,至初次免疫后的第 6 周时,心脏灶性炎症细胞浸润的程度加重,其中 2 只大鼠心脏病理切片中还观察到心瓣膜灶性炎症细胞浸润。上述结果提示大鼠已发生了心脏炎。因心脏炎症发生于注射链球菌全菌体抗原之后,故认为心脏炎与链球菌抗原的刺激有关。同时,由于炎症细胞主要在心肌血管旁或瓣膜中呈灶性浸润现象,提示了内皮细胞及其在心脏炎的发病过程中可能

有重要作用。

由于风湿热的病理改变是结缔组织炎症,其典型及特征性病理改变是出现阿孝夫小体(Aschoff body)^[13-14]。因本研究大鼠心脏未发现典型的风湿性心脏炎病变(出现明显的类阿孝夫小体),渗出细胞为非特异性炎症细胞,提示本研究观察至免疫后第 6 周时,模型 B 组大鼠心脏病理的炎症改变可能还处于渗出期。所以欲诱导出典型的风湿性心脏炎病变,观察时间还需继续延长。

简言之, 本研究的初步结果提示以 Lewis 大鼠为对象, 使用多次皮下注射灭活的链球菌全菌体的方法, 可以诱发大鼠发生心脏炎, 值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 郭晓碧, 郭衡山. 急性风湿热的诊断与治疗进展 [J]. 新医学, 2001, 32(5): 306-308.
- [2] Carapetis JR, Mcdonald M, Wilson NJ. Acute rheumatic fever [J]. Lancet, 2005, 366(9480): 155-168.
- [3] 黄建林, 余步云, 古洁若. 从风湿热患者咽喉中分离出 A 组 β 溶血性链球菌 1 株 [J]. 实用医学杂志, 2006, 22(9): 1058.
- [4] Fukuizumi T, Inoue H, Tsujisawa T, et al. Streptococcus sobrinus antigens that react to salivary antibodies induced by tonsillar application of formalin-killed S sobrinus in rabbits [J]. Infect Immun, 2000, 68(2): 725-731.
- [5] Fukuizumi T, Inoue H, Tsujisawa T, et al. Tonsillar application of formalin-killed cells of Streptococcus sobrinus reduces experimental dental caries in rabbits [J]. Infect Immun, 1999, 67(1): 426-428.
- [6] 罗映辉, 鄢国军, 余俊龙, 等. 细菌繁殖与计数新方法的实验研究 [J]. 实用预防医学, 2003, 10(5): 828-829.
- [7] Murphy GE, Swift HF. The induction of rheumatic-like cardiac lesions in rabbits by repeated focal infections with group A streptococci; comparison with the cardiac lesions of serum disease [J]. J Exp Med, 1950, 91(5): 485-498.
- [8] Murphy GE, Swift HF. Induction of cardiac lesions closely resembling those of rheumatic fever in rabbits, following repeated skin infections with group A streptococci [J]. J Exp Med, 1949, 89(6): 687-698.
- [9] 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]. 中山医学院学报, 1983, 4(2): 68-74.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Madeleine W. Cunningham. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(3): 470-511.
- [13] 余步云. 风湿热和风湿性心脏病 [M]. 广州: 广东科技出版社, 2007: 36-38.
- [14] Chopra P, Gulwani H. Pathology and pathogenesis of rheumatic heart disease [J]. Indian J Pathol Microbiol, 2007, 50(4): 685-697.

(编辑 刘清海)

(上接第 50 页 from page 50)

- culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research [J]. Stem Cells, 2006, 24(12): 2888-2990.
- [5] Dimarakis I, Levicar N. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research [J]. Stem Cells, 2006, 24(5): 1407-1408.
- [6] 刘爱军, 项平, 黄锦桃, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对大鼠骨髓间质干细胞增殖的影响 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(6): 508-511.
- [7] Karimi K, Redegeld FA, Heijdra B, et al. Stem cell factor and interleukin-4 induce murine bone marrow cells to develop into mast cells with connective tissue type characteristics in vitro [J]. Exp Hematol J, 1999, 27(4): 654-662.
- [8] Lin HT, Tarng YW, Chen YC, et al. Using human plasma supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential [J]. Transplant Proc, 2005, 37(10): 4504-4505.
- [9] Takagi M, Umetsu Y, Fujiwara M, et al. High inoculation cell density could accelerate the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocyte cells [J]. J Biosci and Bioeng, 2007, 103(1): 98-100.
- [10] 曲彦隆, 杨卫良, 孟祥文, 等. 梯度降解软骨支架材料应力刺激下与骨髓基质干细胞复合三维培养的实验研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(10): 772-774.
- [11] Miyazaki M, Hardjo M, Masaka T. Isolation of a bone marrow-derived stem cell line with high proliferation potential and its application for preventing acute fatal liver failure [J]. Stem Cells, 2007, 25(11): 2855-2863.

(编辑 徐杰)