

# 鏈球菌眼结膜下注射誘发家兔风湿 性心脏炎的初步报告

(风湿性心脏炎动物模型的试制)

余步云

(第三附属医院内科)

实验性风湿性心脏炎的研究,对风湿热发病机制、诊断和治疗具有十分重要意义。本文报告了28例链球菌感染后家兔的化验室检查及病理变化,着重报道4例风湿性心脏炎家兔的病理组织改变。

## 实 驗 方 法

**动物选择和分组** 全部实验动物系由本院动物场繁殖和饲养的家兔,年龄6~12月,体重3.5~4市斤,毛色纯白。实验前先测定血沉、抗链“O”、血清糖蛋白电泳、C反应性蛋白(CRP)、白细胞数及分类,其数值均在正常范围内。全部家兔随机抽样按感染途径分组:(1)链球菌结膜感染组(简称结膜组),雌兔10头,雄兔8头。(2)链球菌皮下感染组(简称皮下组),雌兔6头、雄兔4头。(3)生理盐水对照组(简称对照组),雌兔6头,雄兔5头。

**感染动物方法** 从急性活动性风湿热患者咽喉部分离出溶血性链球菌及草绿色链球菌菌株,于肉汤培养基中繁殖48小时后,用无菌生理盐水洗3~5次,制成每毫升含60亿活菌的生理盐水悬液,放置冰箱中保存,作为感染动物的材料。结膜组及皮下组系采用分别交替注射链球菌于两侧睑结膜下及双侧背部(后腿上方)皮下组织。每周注射2次,每次注射细菌悬液0.1毫升(含活菌6亿),共7周。对照组是用无菌生理盐水0.1毫升注射睑结膜下,注射间隔及总次数与感染组同。

**观察方法** 注射期间,每周测血沉、抗链“O”、糖蛋白电泳<sup>(1)</sup>、C反应性蛋白、白细胞数及分类,以上各项均取自空腹家兔耳缘静脉的同一血标本,停注后每隔2周复查一次。按不同间隔(10周、12周、16周及24周)解剖动物,观察其病理组织改变。

## 实 验 结 果

结膜组 8 例中有 4 例产生类似风湿性炎症的心脏改变, 余 4 例仅发生单纯性链球菌感染。皮下组 10 例化实验室及病理结果亦符合单纯性链球菌感染, 无一例发生风湿性心脏炎。对照组 11 例之化实验室及病理组织均无明显变化。

## 一、单纯性链球菌感染 (24 例)

**各项化验结果** 产生单纯性链球菌感染家兔 (包括结膜组 14 例, 皮下组 10 例, 在注射链球菌过程中有半数呈轻度及短暂的血沉加速, 大多数均有过短暂的抗链“O”滴度升高,  $\alpha_1$  及/或  $\alpha_2$  糖蛋白增高以及白细胞数上升, 有 2 例有 C 反应性蛋白阳性 (见表 1) )。

表 1 单纯性链球菌感染家兔与正常对照组家兔化实验室检查比较

	ESR		抗链“O”		C 反应蛋白		白细胞数		$\alpha_1$ 及/或 $\alpha_2$ 糖蛋白			
	加速例数	速度 mm/h	持续时间	增高例数	滴度	持续时间	阳性例数	持续时间	增高例数	白细胞数	增高例数	持续时间
结膜组 (14 例)	8	3 ~ 5	2 ~ 3 周	14	1/50	2 ~ 4 周	1	1 ~ 2 周	10	>12000	11	1 ~ 4 周
皮下组 (10 例)	4			7	1/62.5	1	4	10				
对照组 (11 例)	0	0 ~ 3		0	<1/50		0		0	<12000	5*	1 ~ 2 周

\* 此 5 例注射前后比较, 其  $\alpha_1$  及/或  $\alpha_2$  糖蛋白的增高, 无统计学之显著性,  $P > 0.05$ 。

**心脏病理变化** 肉眼检查无明显改变。显微镜下可见瓣膜水肿及增厚 5 例, 瓣膜粘液样变性 13 例, 心肌间质淋巴细胞浸润 6 例。心内膜细菌性炎症 3 例, 此 3 例之瓣膜赘生物成份主要由血小板、大量白细胞、细菌和坏死的心瓣膜组织构成。

## 二、风湿性心脏炎 (4 例)

**各项化验结果** 此 4 例家兔的血沉、抗链“O”、C 反应性蛋白、 $\alpha_1$  及/或  $\alpha_2$  糖蛋白及白细胞数变化均较单纯性链球菌感染明显, 表现为血沉加速幅度较大, C 反应性蛋白阳性程度较强, 各项检查变化持续时间较长, 至解剖时仍未下降 (见表 2)。与单纯性链球菌感染另一个明显不同的特点是: 血沉、 $\alpha_2$  糖蛋白及白细胞数之动态变化呈现比较明显之双峰曲线, 反映两个不同的病理过程, 第一个峰反映单纯性链球菌感染,

第二个峰反映了风湿性炎症变化。从图2可见血沉、 $\alpha_2$ 糖蛋白与白细胞数的第二个峰均在链球菌注射后2~3周(即第9~10周开始),正与抗链“O”的高峰和C反应蛋白阳性时间相接近。

表2 4例风湿性心脏炎家兔的化验结果

观察时间	血沉		抗链“O”		C反应蛋白		白细胞数		糖蛋白电泳*				
	速度 mm/h	持续时间	滴度	持续时间	反应	持续时间	总数/ mm <sup>3</sup>	持续时间	$\alpha_1$		$\alpha_2$		
									%	持续增高时间	%	持续增高时间	
R <sub>14</sub>	2 1/2月	3	2周	1/125	3周	(-)	/	11200	1次	46.67	4周	31.74	8周
R <sub>32</sub>	3+月	7	8周	1/125	4周	廿	2周	13000	6周	27.00	4周	36.50	9周
R <sub>20</sub>	4月	13	9周	1/62.5	8周	+	2周	22200	12周	29.44	2周	30.52	8周
R <sub>4</sub>	6月	38	8周	1/62.5	16周	+	2周	19850	12周	37.00	8周	48.80	12周

\* 家兔糖蛋白正常值:  $\alpha_1$  24.29 ± 6.08,  $\alpha_2$  23.94 ± 4.48

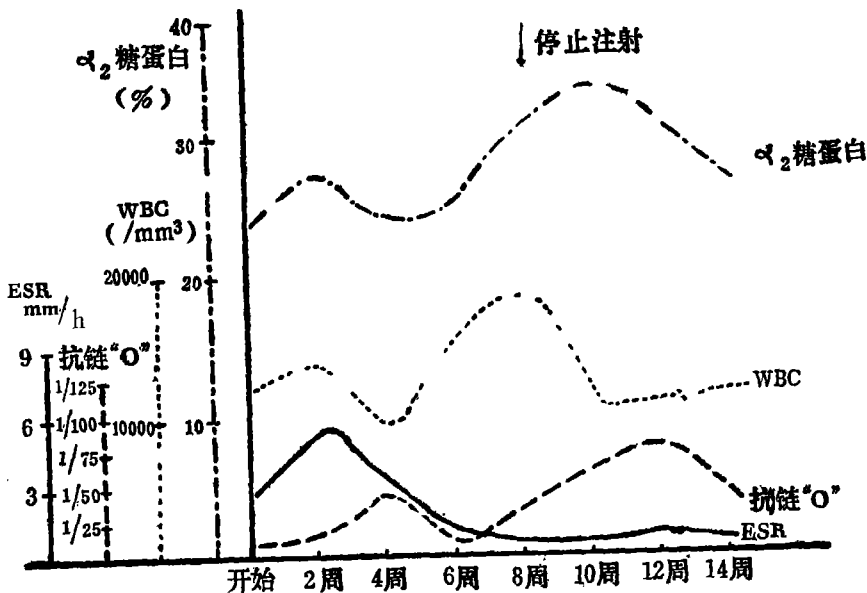


图1 单纯性链球菌感染家兔(R<sub>5</sub>)之化验室检查曲线

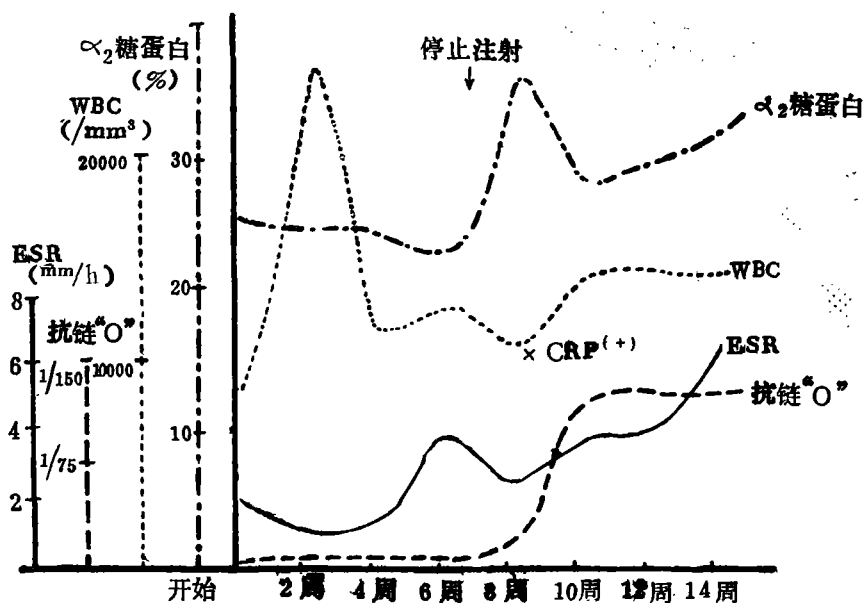


图2 风湿性心脏炎家兔 ( $R_{32}$ ) 的化验检查曲线 ( $\alpha_2$ 糖蛋白、白细胞数、血沉呈双峰型曲线)

**心脏病理组织切片变化:** 湿性心脏炎家兔的改变如下:

(1) 粘液样变性 4例家兔心瓣膜均有粘液样变性,二尖瓣4例、三尖瓣及主动脉瓣各2例,上述病变除用苏木素伊红染色检查外,还采用了甲苯胺蓝染色法和胭脂染色法加以证实。

(2) 结缔组织增生 3例家兔 ( $R_{32}$ 、 $R_{29}$ 、 $R_4$ ) 发生灶性结缔组织增生,部位均在二尖瓣上,其中2例结缔组织增生处,还可见到肥大的纤维母细胞增生。

(3) 风湿性赘生物 2例家兔 ( $R_{32}$ 、 $R_4$ ) 二尖瓣心房面闭锁缘处,肉眼可见到1~2毫米大小、浅褐色疣状成排赘的生物形成(图5)。显微镜下赘生物由纤维素混有血小板构成,其内有几个淋巴细胞、中性白细胞浸润,赘生物基底已由纤维母细胞所机化,排列成栅状,此2例家兔均作过心血细菌培养,曾用美兰及革兰氏染色法作切片检查,均无细菌发现,可见为急性风湿性瓣膜炎改变(图1,2)。

(4) 类阿孝夫氏小体 在1例家兔 ( $R_{14}$ ) 之左心室肌间质中,可见到灶性细胞增生,细胞成分主要是较为肥大的纤维母细胞,有些细胞具有1—2个巨大的细胞核,核呈卵圆形或梭形,染色很深,胞浆呈淡蓝染色,体积较大,胞浆丰富,在这些细胞之间还可见到少量红细胞及个别成熟的白细胞,此为急性风湿性心肌炎的病理改变(图3)。

(5) 纤维素样坏变 在1例家兔 ( $R_4$ ) 的二尖瓣上可见到轻度的纤维素样坏变,在苏木素伊红染色中,病变处呈同质状染成深红色,具有较强折光性(图4)。

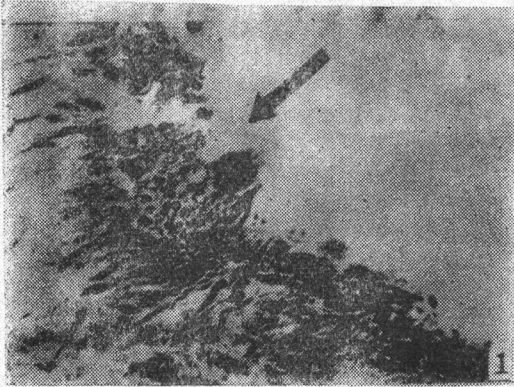


图1 家兔R<sub>4</sub>二尖瓣膜赘生物(高倍镜)箭头所示之赘生物由纤维素(黑色)混有血小板所构成,其内有几个淋巴细胞及中性白细胞浸润,赘生物基底有纤维母细胞增生,排列成栅状(HE染色)

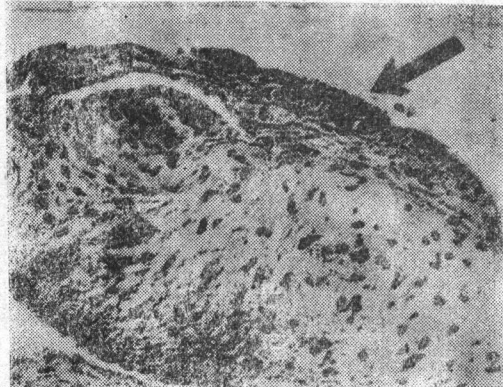


图2 家兔R<sub>20</sub>二尖瓣赘生物(高倍镜)赘生物已发生机化,绝大部分由新生纤维母细胞所代替,表面尚残留少许赘生物(纤维素),箭头所示为残留之赘生物(HE染色)

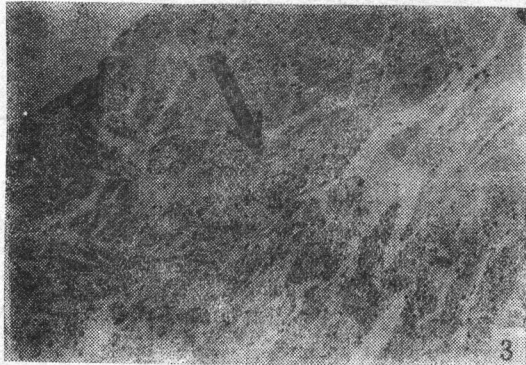


图3 家兔R<sub>14</sub>心肌间质中可见类阿孝夫氏小体(箭头所示之处)(低倍镜, HE染色)

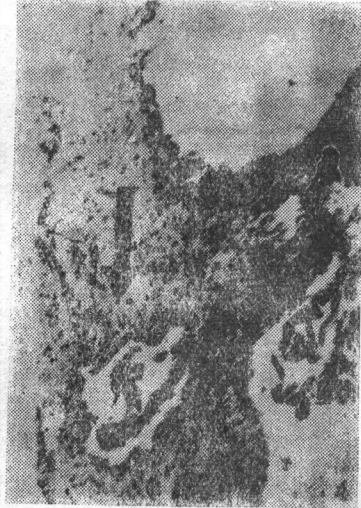


图4 家兔R<sub>4</sub>二尖瓣,箭头所示处有纤维素样坏变

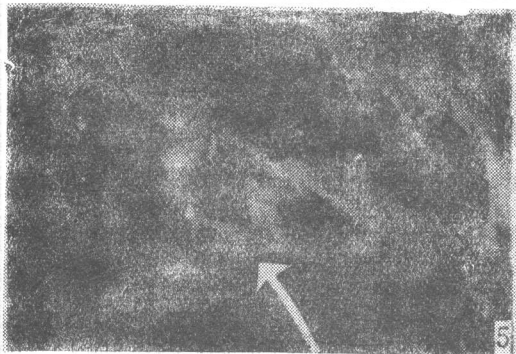


图5 家兔R<sub>4</sub>之肉眼标本,可见二尖瓣增厚及水肿,箭头所示处可见心房面闭锁缘处之赘生物,并见腱索增粗,粘连,缩短及乳头肌增粗

除以上组织学改变外,肉眼检查,4例家兔均可见有二尖瓣膜增厚,腱索增粗、或粘连、缩短。2例(R<sub>4</sub>、R<sub>32</sub>)有乳头肌增粗的改变(图5)。

此4例家兔所具有的上述病理变化,基本上与人类风湿性心脏炎的病理变化相近似。

## 讨 论

实验性风湿性心脏炎动物模型的研究,自1949年Murphy<sup>(2)</sup>报道通过皮内注射溶血性链球菌,在极少数家兔中成功地诱发典型的风湿热病变以后,不少作者从事这方面的研究。但是,典型的风湿病变,特别是阿孝夫氏小体和纤维素样坏变的发生率一直非常之低,即使在一个动物成功了,其在心脏的病变范围也是非常细小,动物模型的重复性,仍是个悬而未决的问题。如Yulchi Otaka经过约十年的研究,在89只家兔中,亦只不过3例家兔产生近似人类的阿孝夫氏小体病变<sup>(3)</sup>,这3例家兔是通过溶血性链球菌在皮内、静脉、上颌窦重复注射以及喷喉,历时81~116周才成功的。

近年来,随着免疫学的发展,尤其是免疫机制在风湿热发病中的作用的研究,不少作者从注射链球菌进而应用同种或异种血清注射,心脏组织加上不同的佐剂注射等,试图提高动物模型的成功率,但尚未见满意的报道。

本文实验应用链球菌注射家兔眼结膜下来诱发风湿性心脏炎,系引用郭景元氏用眼结膜下注射法制备沉淀素血清的经验,即眼结膜下注射法。此法能最节省抗原地产生抗血清<sup>(4)</sup>,因而在动物体内所形成的链球菌抗体,较之通过其他部位接种者为高。从本文两组动物(结膜组与皮下组)的结果看来,结膜组产生4例风湿性心脏炎改变,而皮下组无一例诱发风湿病变,如此明显的差异,应考虑与感染途径不同有关。

动物实验总有个体的差异性,本文18例用链球菌眼结膜注射的家兔中,有4例产生风湿性心脏炎。其中2例产生有特征性的风湿热病理变化(其一为心肌间质的类似阿孝夫氏小体,另一为二尖瓣膜纤维素样坏变并风湿性赘生物形成),另2例虽缺乏上述特征性病理改变,但肉眼上均有二尖瓣腱索增粗、粘连、缩短,乳头肌变粗,组织学上有瓣膜粘液样变性、结缔组织增生以及风湿性赘生物等病变。此4例的一系列实验室结果,与单纯性链球菌感染有明显的区别,特别是链球菌注后数周,直至解剖前,抗链“O”持续升高、血沉、白细胞和 $\alpha_2$ 糖蛋白等曲线的第二个高峰的出现,均显示临床风湿热活动的证据,从病理变化结合临床化验结果来看,可以说明风湿性心脏炎是存在的。

## 后 记

本实验于1966年完成,由于“文革”及其他种种原因,未予发表。鉴于迄今为止,国内尚未见有这方面的材料报道,国外报道亦为数不多。加以在开展风湿热及风心病的研究工作过程中,有些兄弟院校亦希望我们提供这一实验资料,故在原有基础上,再加整理补充,予以发表。本实验的病理组织学改变,经病理教研组梁伯强、秦光煜、李璘等教授鉴定,李璘教授并对有关工作进行指导,特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] 余步云: 151例风湿病患者的血清糖蛋白电泳分析。新医学 11(4): 175, 1980
- [2] Murphy G E and Swift H F: The induction of cardiac lesions, closely resembling those of theumatic fever in rabbits following repeated skin infection with group A streptococci. J Exp Med 89: 687, 1949
- [3] Yulchi Otaka: Immunopathology of Rheumatic Fever and Rheumatoid Arthritis. p139~149, IGAKU SHOIN LTD. Tokyo, 1976
- [4] 郭景元: 用眼结合膜下注射法制备沉淀素血清的进一步研究——抗人精液沉淀素的制备。微生物学报8(2): 215, 1960

## A Preliminary Report of the Induction of Rheumatic Carditis in Rabbits by Injecting Streptococci Subconjunctivally—An Attempt for Making Animal Model of Rheumatic Carditis

Yu Buyun

(Department of Internal Medicine,  
Third Affiliated Hospital, Zhong Shan Medical College)

## Abstract

18 rabbits were studied with the repeated streptococcal subconjunctival injection method. The bacteria were isolated from the throats of the patients with rheumatic carditis. All animals were killed at the end of the ex-

periment. After T weeks injection, 4 rabbits later proved to have rheumatic carditis showed a rise in ESR, a high streptolysin O titer and a rise in serum glycoprotein. 3 out of 4 rabbits showed an increase in white blood cell count and a positive CRP. Edema and adhesion of valves and chordae tendineal thickening and shortening of valves and papillary muscles were found grossly. Histological study revealed Aschoff body-like granuloma in the myocardial interstitial connective tissue one rabbit and vegetations in the mitral valves of the other 2 rabbits. Additionally, the occurrence of fibrinoid degeneration was found in the mitral valve of a rabbit, while mucoid degeneration was found in all of these four animals.

In contrast with the two control groups ( 10 rabbits injected with streptococci subcutaneously, 11 rabbits injected with normal saline subconjunctively ), no animal developed rheumatic carditis.