

实验性亚急性结核病及其治疗对高级 神经活动和免疫反应的影响

王 慧 芬*

(中国医学科学院实验医学研究所细菌免疫学系)

导师 谢少文教授

(中国医科大学微生物教研组)

徐氏^[1]以小白鼠实验,研究了急性结核传染过程中动物的高级神经活动,和吞噬、抗体产生等非特异性免疫反应的改变及其相关性,初步证明了小鼠中的这些改变与较大动物的反应大致相同。为了进一步观察这些改变,并研究治疗后各种反应的变化,我们用较小剂量的结核菌感染小鼠,造成亚急性传染过程,其中部分动物用异菸肼治疗,长期地观察了上述各种反应的改变及其相互关系。

一、实验材料和方法

(一) 动物: 小白鼠, 雄性, 瑞士种, 体重 18—22 克。由中国医学科学院供给。

(二) 菌种和感染方法: 人型结核杆菌 H₃₇Rv, 于罗氏培养基上传代, 冰箱保存。应用前取出, 在罗氏培养基上连续传种二次。每次在 37℃ 培养 7 天, 然后制成生理盐水悬液。每鼠尾静脉注射 0.5 毫升, 含菌 0.005 毫克(湿重)。菌液制备和感染方法与徐氏^[1]相同。

(三) 条件反射方法: 感染前先使小鼠形成运动性食物条件反射, 条件反射装置和试验方法与徐氏^[1]相同, 仅略加改变, 可同时进行 4 只小鼠实验。以强光(75w 电灯光)为阳性条件刺激物, 用蒸玉米糕强化, 弱光(15w 电灯光)为分析性条件刺激物, 不与强化, 每次条件刺激作用 30 秒钟, 阳性条件刺激在作用 20 秒后开始强化 60 秒。每次实验, 阳性和分化性刺激交替给与, 间隔 1—2 分钟, 共作用 10 次。自给与条件刺激开始至小鼠跑到食槽时间, 作为条件反射潜伏期; 在条件刺激作用时间内, 小鼠停留于食槽处的时间为反射量。

当条件反射建成并巩固后感染结核菌, 自感染 12 小时起每日、以后隔日检查条件反射。治疗后继续观察, 直至实验終了。

(四) 抗体产生实验: 共用 120 只小鼠, 分成 12 组, 每组 10 只, 其中 6 组感染结核菌, 另 6 组不感染, 作为对照。感染和不感染动物中各有 2 组, 自感染后第 5 周开始口服异菸肼, 剂量为每公斤体重每日 5 毫克, 连续 4 周。感染组于感染 2、4、6、8 周后, 治疗组于治疗 2、4 周(即感染 6、8 周)后, 分别经尾静脉注射 10% 羊血球 0.1 毫升, 进行免疫, 一周后取血, 分离血清, 测定 50% 溶血素滴度。

50% 溶血素滴度测定方法系按本系三分之一量法^[2]进行。小鼠血清置 60℃ 加热 4 分钟灭活后, 自 1:50、1:100、1:200、1:300、1:400、1:500 起跳管稀释, 最后每管含有不同浓度的稀释血清 0.2 毫升。抗原用新鲜绵羊血液, 用生理盐水洗三次, 最后配成 1% 血球悬液, 每管加入 0.2 毫升。补体用新鲜豚鼠血清, 按常法滴定, 每管加入 0.3 毫升, 内含二个恰定单位。加入上述成分后, 每管再补充盐水 0.3 毫

本稿收到日期为 1962 年 7 月 5 日。

* 现在石家庄河北医学院微生物教研组。

升,使最后总量成为 1 毫升。然后放 37℃ 水浴,作用 30 分钟,取出后立即以 3000 转/分离心 4 分钟,将未溶解的血球沉下,各管上清与标准管(按余氏^[3]法配制)比较,读出其溶血百分度,在座标纸上画成曲线,找出 50% 溶血滴度。同时作抗原、抗体、补体对照,以排除各种非特异性反应。

(五) 白血球吞噬反应实验: 动物数量和分组与抗体产生组相同,于感染 2、4、6、8 周和治疗 2、4 周后,分别以金黄色葡萄球菌进行体内吞噬试验,实验方法与赵氏法^[4]相同。

(六) 病理组织学检查: 取小鼠 15 只,按上法感染结核菌,其中 5 只自感染后第 5 周起用异菸肼治疗。感染组于感染后 4 和 8 周各杀死 5 只,治疗组于治疗 4 周(感染 8 周)后杀死,检查肺、肝、脾、肾、脑的巨体病变;并以 10% 福尔马林固定,切片,用苏木素-伊红和抗酸染色法染色,作病理组织学和结核菌检查。

(七) 治疗方法: 取异菸肼一片(50 毫克),研碎,加蒸馏水 5 毫升,制成均匀悬液,每日将此药液 0.02 毫升(相当于 5 毫克/公斤体重)滴于食物上,使动物自由食入,并随动物体重的增加而增加药液浓度。

二、结 果

(一) 对条件反射组的影响: 共用小鼠 30 只,其中 20 只静脉注射结核杆菌,其余 10 只注射等量生理盐水作为对照。前者中半数动物自感染后第 5 周起用异菸肼治疗。条件反射改变情况如下:

感染组: 在感染后 12 小时至 14 天内,绝大多数动物都出现了条件反射的改变,17 只动物在 7 天内出现改变。其最初改变,大多数为内抑制减弱,表现为分化抑制解除,或同时伴有阳性条件反射潜伏期缩短,反射量增加;少数动物(5 只)在感染后 2—3 天内,内抑制加深,分化性条件反射潜伏期延长,反射量减低,阳性条件反射或增高或减低不定,这些动物以后也都或早或晚由内抑制加深转变为内抑制减弱,兴奋性增高。兴奋状态持续时间的长短和强度,各动物不尽相同,自感染后 30—57 天,多数动物自感染 40 天后,兴奋性逐渐下降,阳性条件反射潜伏期显著延长,反射量减低,分化性抑制加深或无改变。

动物一般行为,在感染初无明显改变,至感染一月后,有些动物表现兴奋,在实验箱内跑跳不停,非特异性防御反应增强,企图咬实验者的手。兹以 141 号鼠为例说明于图 1。

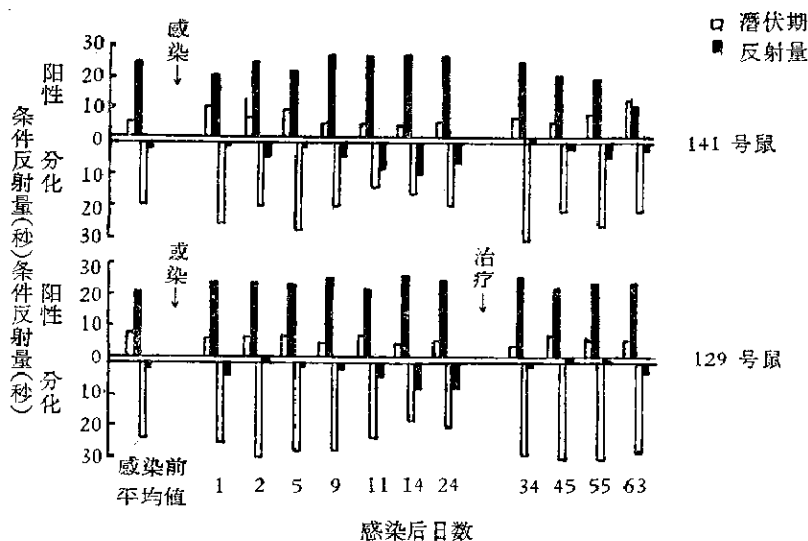


图 1 结核感染和治疗过程中小鼠条件反射的改变(141 号和 129 号鼠)

治疗组: 感染初期的改变与上述相同,主要是内抑制减弱,兴奋性增高。经治疗 4 周,即感染 8 周后,至实验结束时,与不治疗的感染组相反,大多数动物(80%)仍保持在兴奋状态,其中 5 只内抑制有所加强。此外,137 号鼠于治疗后阳性条件反射下降,潜伏期延长,反射量减低,但仍保持在感染前的水平。138 号鼠感染前条件反射一直未能形成,阳性条件反射甚低,分化性抑制甚弱,一般行为表现兴奋;在感染初期,阳性条件反射曾有短期增高,以后又恢复常态;到治疗初期,兴奋和抑制都略有加强,但迅速转为深度抑制,阳性和分化性条件反射都显著下降。兹以 129 号鼠为例,说明治疗组的一般情况(图 1)。

表 1 总结了感染组和治疗组的总情况。

表 1 结核感染及其治疗过程中小鼠条件反射的变化

感染周数 (治疗周数)	组 别	动物总数	条 件 反 射 表 现					
			兴 奋		正常或波动		抑 制	
			动物数	%	动物数	%	动物数	%
2	感 染	20	13	65	4	20	3	15
4	感 染	20	16	80	3	15	1	5
6(2)	感 染	10	7	70	2	20	1	10
	治 疗	10	7	70	2	20	1	10
8(4)	感 染	10	2	20	1	10	7	70
	治 疗	10	7	70	0	0	3	30

对照组: 10 只小鼠,静脉注射生理盐水后观察 7 天,未见条件反射有何明显改变。以后,其中半数每日喂食异菸肼 5 毫克/公斤,连续 20 天,条件反射未出现任何规律性改变。

(二) 对抗体(溶血素)产生的影响: 由表 2 可以看出,在感染 2 周后,小鼠溶血素滴度已有升高,以后继续增高,至感染 6 周后达最高峰,其滴度为正常对照的 357%,8 周后

表 2 结核感染及其治疗过程中小鼠产生溶血素的滴度(50% 终点)

感染周数 (治疗周数)	组 别	动物数	平均滴度	标准差	差别(%)	机率(P)	显著性
2	感 染	10	1152	415.9	169	<0.05	显 著
	正常对照	10	687	103.4	100		
4	感 染	10	951	175.2	196	<0.05	显 著
	正常对照	10	486	268.2	100		
6	感 染	9	1852	902.2	357	<0.01	很 显 著
	正常对照	10	518	228.4	100		
6(2)	治 疗	9	1063	524.8	221	<0.05	显 著
	药物对照	8	480	223.7	100		
8	感 染	7	571	429.0	167	>0.05	不 显 著
	正常对照	10	336	195.9	100		
8(4)	治 疗	9	528	356.4	170	>0.05	不 显 著
	药物对照	7	311	259.3	100		

注: 溶血素滴度即产生 50% 溶血的血清稀释倍数。

则下降至仅略高于对照组,统计学无显著意义。感染后经过治疗者,于感染 6 周即治疗 2 周后,溶血素滴度虽仍高于对照组,但比感染不治疗者为低。感染 8 周(治疗 4 周)后,同不治疗组相近,略高于正常但不显著。

(三) 对吞噬反应的影响: 感染 2 周后白血球的吞噬百分数已有显著增高, 4 和 6 周后增加尤著,至 8 周后下降至正常以下。治疗组在治疗 2 周(即感染 6 周)后已经下降至接近正常水平, 4 周(即感染 8 周)后降至正常以下,与感染组相似。结果见表 3。

表 3 结核感染及其治疗过程中小鼠白血球吞噬百分数

感染周数 (治疗周数)	组 别	动物数	平均吞噬%	标准差	差别(%)	机率(P)	显著性
2	感 染 正常对照	10	26.4	13.9	144	<0.05	显 著
		10	18.9	9.1	100		
4	感 染 正常对照	12	36.8	14.1	211	<0.05	显 著
		10	17.4	11.7	100		
6	感 染 正常对照	10	44.6	19.1	170	<0.05	显 著
		10	26.3	10.4	100		
6(2)	治 疗 药物对照	9	31.3	12.3	123	>0.05	不 显 著
		9	25.4	16.3	100		
8	感 染 正常对照	12	20.3	16.0	80	>0.05	不 显 著
		10	25.4	7.7	100		
8(4)	治 疗 药物对照	9	18.5	12.3	79	>0.05	不 显 著
		9	23.8	8.3	100		

注: 吞噬百分数即在 100 个中性多核白血球中吞菌白血球数。

(四) 病理改变: 在感染 2 周后肺部已形成明显可见的结核结节, 直径约 1 毫米左右, 数量不多, 孤立散在, 脾肿大, 其他脏器如肝、肾、脑等未见异常。随着感染时间的加长, 病变增大, 数量也加多, 至感染 8 周后, 病变多呈融合状。治疗组病变数量较少。

镜下病变主要有三种类型: (1) 上皮样细胞增生; (2) 淋巴样细胞和大吞噬细胞浸润; (3) 细胞坏死。感染 4 周者, 病变数量较少, 细胞坏死少见, 主要是淋巴样细胞和大吞噬细胞浸润, 上皮样细胞增生, 后者有时形成结节状, 但多不典型, 这两种病变常互相混合同时存在。感染 8 周后病变增多增大, 细胞坏死较多, 三种病变同时存在。治疗组病变较少,

表 4 小鼠结核感染及其治疗过程中的肺、脾病变

感染周数 (治疗周数)	组 别	动物总数	不同肺部病变程度动物数				脾脏大小平均值(毫米×毫米)	
			+	++	+++	++++	实 验 组	对 照 组
2	感 染	8	5	3	—	—	—	17.0×4
4	感 染	6	2	4	—	—	25.6×7	
	感 染	9	—	4	5	—	—	
	治 疗	9	6	4	—	—	—	
8(4)	感 染	7	—	—	1	6	26.0×7	
	治 疗	9	—	1	6	2	25.0×7	

坏死少,主要是前二种病变,泡沫状大吞噬细胞显著较不治疗组为多。所有各组病变内均未见有多核巨噬细胞和纤维化病变。

肝脏内有少数单核细胞浸润小块。脾脏有轻度滤泡增生。肾、脑切片未见异常。

抗酸染色证明,在治疗和不治疗各组病灶内都有多数结核菌存在,尤其感染 8 周后不治疗者最多,常多数成团,无法计数。治疗组菌数较少,多呈 3—5 个菌的小束存在于病灶中。脾脏在感染 4 周者,也可见少数结核菌散在。其他脏器内未找到结核菌。见表 4。

以上各项实验结果的相关情况可综合如图 2。

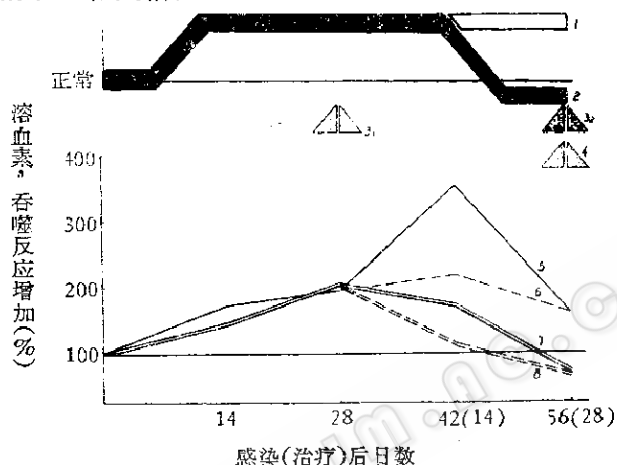


图 2 结核菌(新鲜培养)感染及其治疗过程中高级神经活动和免疫反应相关趋势(拟构图)

1. 条件反射治疗组; 2. 条件反射感染组; 3, 4. 感染组病理改变; 4. 治疗组病理改变; 5. 感染组溶血素; 6. 治疗组溶血素; 7. 吞噬反应感染组; 8. 吞噬反应治疗组。

三、讨 论

由上述结果看来,在小鼠亚急性结核感染时,其高级神经活动也同较大动物一样,在初期是趋向于兴奋的,同时非特异性抗体的产生和吞噬作用也有所加强,这可能是机体与结核病作斗争的一种表现。当疾病发展至严重阶段,高级神经活动则转为抑制,此时非特异性抗体的产生和吞噬作用也显著减低,动物一般表现活动减少,食量减少,体重减轻,这显然是疾病加重。机体衰弱的表现。可能由于传染过程的发展,使皮层产生了保护性抑制,抑制不断加深,并扩散到皮层下部位,因而使抗体产生和吞噬功能也减低。在开始治疗之后,由于病原体的作用受到抑制,有机体的防御机能能够继续发展,这样就有可能得到痊愈。这也可能作为结核病化学治疗作用的一种解释。正象大家所想象的一样,药物在体内虽然有抑菌作用,但病的根治还是要靠机体本身防护机能的复合作用。本试验的结果也许可以作为这样解释的初步证据。

Попова 氏^[5]用牛型结核菌感染家兔,在感染初期,动物就产生了高级神经活动的抑制,链霉素单独或与碳酸铋合并应用治疗之后,条件反射的抑制迅速减弱,与感染组相比,白血球吞噬活性也较高。与本试验相比,高级神经活动在治疗后的反应基本相似,而白血球吞噬反应则不同。这可能与他所用动物、菌种和药物与我们不同有关,特别是从细菌感染剂量、动物病变和死亡情况来看,其感染过程是急性而严重的,与本实验难以对比。究竟如何,尚需进一步研究阐明。

为了减少非特异性刺激对高级神经活动的影响,我们采用了喂食的方法给药,即以药物滴于一小块食物上,目睹动物食完,再将其放回原笼内,继续补足其喂食定量。由预备实验和以上实验过程中所得结果,都证明每天口服异菸肼 5 毫克/公斤对小鼠实验性结核感染有显著疗效,表现在动物生存日期长(感染组在 2—4 个月内大多数死亡,而治疗组却多数活存),体重不减轻(感染组至晚期体重急速下降),肺部病变较轻,后者在感染三个月后差别尤为明显。加以此法应用简便,对动物没有刺激性,所以我们认为,在研究异菸肼治疗对高级神经活动的影响上,还是一个比较适用的方法。

以小鼠作为实验模型研究结核病,已有相当久的历史,但过去学者们感染的剂量都很大,致使动物很快死亡,难于详细观察结核病程中机体各种反应的改变。为此,我们试用较小剂量感染,使动物生活相当长的时期,可以比较细致地观察机体各种反应的变化。但剂量愈小,操作时的误差影响愈大,欲使每只动物的病变程度严格一致是比较困难的。同时在这样剂量感染时,大多数动物的病变不十分典型,虽有上皮样细胞,但不呈结核样排列,有的呈一般炎症反应,淋巴样细胞浸润,但也有的出现干酪样坏死。可见感染方法尚需进一步改进,对小剂量感染时小鼠结核病变的特点,也还值得深入研究。

四、结 论

以人型结核杆菌 H₃₇Rv 0.005 毫克尾静脉注射感染小鼠,可形成亚急性传染,动物生存 2—4 个月。在此病程中,动物的高级神经活动和非特异性免疫反应产生一系列的改变。在感染初期,大脑皮层兴奋性升高,内抑制减弱,同时非特异性抗体的产生和吞噬反应增强;至感染晚期,皮层抑制,抗体产生和吞噬反应也减低。感染后经异菸肼治疗者,至实验終了(感染 8 周后),仍保持兴奋状态而未出现抑制。

参 考 文 献

- [1] 徐树林:中华结核病科杂志, (5): 377, 1958。
- [2] 中国医学科学院细菌免疫学系,百分之五十溶血滴度测定方法的比较(未发表资料)。
- [3] 余传霖:内科学报, 3 (8): 745, 1951。
- [4] 赵鄞生:微生物学报, 6 (4): 477, 1958。
- [5] Попова, Л. Г. Патол Физiol и Экспер Терап, 3 (2):47, 1959。

INFLUENCE OF SUBACUTE TUBERCULOUS INFECTION ON CNS ACTIVITIES AND IMMUNE REACTIONS OF WHITE MICE

WANG HUEI-FEN

(Department of Bacteriology, Institute of Experimental Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences)

The response of the higher nervous system and that of nonspecific antibody production and phagocytosis have been studied in white mice with subacute tuberculous infection produced by the intravenous injection of a small dose of Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv. The observations on early release of internal inhibition, followed by increased excitation as the disease progressed, and finally by a tendency to inhibition duplicate those observed in acute experimental infections previously reported in the literature. The nonspecific immune reactions increased from the third to the sixth week after infection, but before death they gradually decreased to normal range. In the animals treated by isoniazid, a delay of inhibition was noticed and the nonspecific immune reactions was increased lesser than in infected. The significance of our observations was briefly discussed.