维普资讯 http://www.cqvip.com



# 抗波形蛋白单克隆抗体的研制、鉴定及初步应用*

病理生理教研室 周 兰 范维珂 韦 克 段积华

**提 要** 用从猪眼晶体中提取的波形蛋白免疫BALB/C小鼠；用杂交瘤技术建立了两株稳定分泌抗波形蛋白单克隆抗体（$IgG_1$亚类）的杂交瘤细胞株：$H_1C_2$和$I_3B_2$；其染色体众数分别为86和90；免疫印迹显示两者均特异地与波形蛋白反应；免疫组化结果：纤维（母）细胞、巨噬细胞、浆细胞、内皮细胞、纤维瘤、恶纤、淋巴瘤、黑色素瘤等呈阳性反应；而神经原、肝、胰、肺鳞癌等呈阴性反应。此抗体的制成，对于正常组织和肿瘤组织的起源鉴定等有一定意义

**关键词** 波形蛋白；杂交瘤技术；免疫印迹；免疫组化；肿瘤病理诊断

波形蛋白（Vimentin，Vim）是哺乳动物细胞骨架的五种中间丝蛋白之一，其分子量在52Kd-58Kd之间，是间叶起源细胞及其所产生的肿瘤细胞的标志物，这已在基础研究和外科病理应用中得到承认。近年发现，Vim除对间叶起源细胞有一定特异性外，尚可在一些非间叶起源细胞中与其它类型的中间丝蛋白共存，其机理尚待阐明[1~3]。

Vim的高效、特异抗体是研究Vim的表达规律和功能的必要试剂；同时，在病理诊断中，对确定间叶起源肿瘤及其与非间叶起源肿瘤的鉴别诊断也具有特殊价值。用Kohler和Milstein创立的杂交瘤技术生产的单克隆抗体（McAb）具有特异、均一及不断分泌的特点，使生产该抗体的技术为之改观。抗Vim的McAb在国外有数种报道，并已商品化供应[4~5]，唯价格昂贵；国内迄今未见报道，仅少数单位依赖进口试剂开展部分肿瘤的中间丝分型工作。我们采用B淋巴细胞杂交瘤技术建立了能稳定分泌抗Vim McAb的两株杂交瘤细胞：$H_1C_2$和$I_3B_2$，希望能为国内Vim的研究及临床应用提供方便。现将建株情况及初步应用结果报导如下。

* 四川省卫生厅科学基金资助

## 材料与方法

### 1. Vim的提取与鉴定

(1)提取采用Geisler氏法[7]，将新鲜猪眼晶体20g剪碎，低温下用Tris-HCl缓冲液制成匀浆(ZS 83-1型内切式组织匀浆器)，离心（Beckman L8-60型超速离心机)54,000g×30m；用含8M尿素的上述缓冲液抽提沉淀中的Vim，4℃过夜；低温超速离心两次（76,000g×30m；76,000g×45m），取其上清用乙醇沉淀，离心后所得沉淀即是Vim粗制品；再过DE32（Whatman）阴离子交换层析柱（22.5×1.9cm），用含0～0.2M NaCl的Tris-HCl缓冲液行线性梯度洗脱，分部收集，紫外分光光度计（Shimadzu UV-300）在280nm波长下测各部OD值，描出其层析图谱；将其中含Vim，同时又含较多杂蛋白的部分再过$CM_32$(Whatman)阳离子交换层析柱（19.5×1.9cm），用含0-0.2M NaCl的甲酸钠缓冲液行线性梯度洗脱，分部收集，并以核酸蛋白检测仪检测其OD值并描出其层析图谱。

(2)鉴定

①十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳SDS-PAGE）测分子量，用夹芯垂直板式电泳仪，

维普资讯 http://www.cqvip.com

参照Tsang氏法[8]，用丙烯酰胺等配成3%浓缩胶、3.3～20%梯度分离胶，制成凝胶板，相应处理后的待检Vim样品及低分子量标准蛋白（上海东风试剂厂生产）按10μg/槽加样。电泳功率5-10w；电泳2.5h后取出凝胶板，置之于固定液、染色液中分别1h、2h；再脱色至蛋白带清晰可见为止。测量标准蛋白迁移距离(X)，将其分子量换算为对数值(Y)，求出两者间的回归方程，再测待检Vim的迁移距离，并由回归方程计算出Vim的分子量。

②负染电镜观察Vim提取物的形态结构：参照Renner[9]，将Vim样品置于含10mM2—巯基乙醇的2mM Tris—HCl(pH7.5)缓冲液中透析，以清除尿素，待蛋白质重聚成丝后滴加于铜网上，干燥后用0.7%醋酸铀水溶液染色5m，透射电镜下观察结果并摄影、测其直径。

③蛋白质浓度测定采用考马斯亮兰G-250蛋白定量法（CBG-250)[10]。取Vim样品及不同浓度的标准牛血清白蛋白溶液各100μl，分别加入5mlCBG-250蛋白试剂，混匀后5～60m内在595nm波长下比色（721分光光度计）测OD值；对已知的牛血清白蛋白浓度（X）与测得的相应OD值（Y）进行回归处理，得其回归方程，再由之算出Vim样品的相应浓度。

**2.分泌抗Vim McAb杂交瘤细胞株的建立**

(1)免疫：在PBS中透析Vim提取物，以除去尿素；调整蛋白浓度为180ug/ml；分别用两种方案免疫6～8周龄的BALB/C雌性小鼠（第三军医大学动物所）。H组：Vim与等量佐剂（首次为弗氏完全佐剂，以后用弗氏不全佐剂）乳化后，行腹腔注射，1ml/只，隔周一次；三次后再经腹腔加强注射一次（无佐剂），1ml/只，第四天进行细胞融合；I组：在乙醚吸入麻醉及无菌条件下，将200μl Vim提取物直接注入小鼠脾内，第四天进行融合。

(2)融合采用本室常规[11]。将免疫小鼠眼眶放血致死，无菌取脾；用无血清RPMI 1640培养液制成脾细胞（SP）悬液，洗涤两次，计数活细胞；另取8-杂氮鸟嘌呤处理过的$NS_1$（取自纽约Sloan-Kettering癌症中心）用上述培养液洗涤两次，计数活细胞；按$SP/NS_1$为2～5/1混合两者，于37℃水浴下1m内加入0.2～0.4ml融合剂，吸打1m后，用含20%新生牛血清(NCS)的RPMI 1640液终止融合，离心去上清，用HAT培养液悬浮细胞，加入含饲养细胞的96孔培养板内，于培养箱（日本池本产。37℃，7%$CO_2$）中培养。

(3)阳性克隆的筛选采用酶联免疫吸附试验(ELISA)间接法[11]。显色结果用酶标光度仪(Bio-Rad E 2250型）在波长492nm下测出OD值，阳性者，再经免疫组化法筛选证实。

(4)克隆化培养：有限稀释法，反复克隆至阳性克隆率为100%。

(5)杂交瘤细胞染色体分析。按本室常规即在已克隆化的细胞中加入秋水仙素，使其终浓度为0.05μg/ml，37℃下培养2h后用0.075M KCl处理细胞，再用甲醇、冰醋酸（3:1）混合液固定两次，20m/次，冰水制片，空气干燥，Giemsa染色，油镜计数100个正值分裂中期、染色体分散良好的细胞，计算其众数。

**3.抗Vim McAb的特性鉴定**

(1)IgG亚类鉴定：琼脂双向扩散法。将已克隆化的阳性杂交瘤细胞的培养上清浓缩约10倍后，与标准羊抗BALB/C小鼠IgG、$IgG_1$、$IgG_{2a}$、$IgG_{2b}$和$IgG_3$（上海生物制品所）行琼脂双向扩散。

(2)抗体效价及特异性测定：ELISA间接法。Vim、神经微丝（NF）、胶质纤维酸性蛋白（GF-AP）及角蛋白（Keratin）均由本室提取。

(3)免疫印迹试验。用Tsang氏法[8]，将SDS-PAGE后的凝胶板上的四种中间丝蛋白转移至硝酸纤维薄膜(NC)上；再分别以这四种蛋白为抗原，杂交瘤分泌的抗体为第一抗体，酶标羊抗鼠IgG抗体为第二抗体，DAB显色后观察结果。

(4)抗体的组织特异性鉴定：用亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)法分析抗体与部分正常组织和肿瘤组织的反应性。组织系本校常规外科病理检查标本(甲醛固定，石蜡包埋)，经病理确诊。ABC试剂为美国Vectastain ABC试剂盒，程序参照本室常规[11]。

**4.腹水单抗的制备**

取8～10周龄BALB/C小鼠，腹腔注入无菌石蜡油0.5ml/只，一周后注入已克隆化的阳性细胞（约$10^5$～$10^6$个/只），2～3周后，其腹部高度膨隆时收集腹水与血清，离心后－20℃保存。

## 结　果

**1.Vim的提取与鉴定**

从猪眼晶体匀浆中提取到Vim粗制品，

维普资讯 http://www.cqvip.com

其SDS-PAGE 结果（图3-1）表明其中含Vim，但杂蛋白尤其是小分子蛋白较多；粗制品过$DE_{32}$离子交换层析柱后得到三个蛋白峰（图1）；其SDS-PAGE结果：Ⅰ峰(图3-2）全是小分子蛋白；Ⅱ峰（图3-4）有少量Vim及较多肌动蛋白(actin)和小分子蛋白；Ⅲ峰（图3-3）仅见Vim及少量actin，作为Vim提取物留用，－20℃保存。从电泳结果计算出Vim分子量为52480，符合波形蛋白的分子量；Ⅲ峰再过$CM_{32}$层析柱后得两个峰(图2)，Ⅰ峰电泳后只见actin带；Ⅱ峰以含Vim为主，不含actin，另外新出现一分子量约45700的蛋白质，估计是Vim的降解产物[12]。Ⅱ峰用作Vim提取物。

在负染电镜下，Vim提取物形成明显的丝状结构，直径8nm；呈网状分布(图4)，符合中间丝特征；CBG-250法测得Vim提取物的蛋白质平均浓度分别为：DE 32Ⅲ峰279μg/ml，$CM_{32}$Ⅲ峰146μg/ml。

## 2.分泌抗Vim McAb的杂交瘤细胞株的建立和鉴定

（1）细胞生长及阳性克隆率：融合后一周，镜下可见细胞克隆生长；两周时，肉眼可见。此时取其上清筛选分泌抗Vim抗体的细胞株：约80%（H组：153/192，I组：229/288)的接种孔内有克隆生长，但ELISA阳性孔不多.将阳性孔上清用免疫组化证实后，从两组中各择一株：$H_1C_2$和$I_3B_2$进行克隆化.

（2）经有限稀释法克隆化3～5次后，两株细胞均达100%阳性克隆率。

(3)染色体检查：$H_1C_2$和$I_3B_2$细胞株的染色体众数为86(78～127)和90(72～142)，均超过其亲本的染色体众数；其核型主要为端着丝点型，并有$NS_1$的标记染色体(中着丝点)，说明它们是融合产生的杂交瘤细胞。

(4)$H_1C_2$连续传代3个月、冻存11月后及$I_3B_2$连续传代4个月、冻存4个月后均能稳定分泌抗Vim McAb。

## 3.Vim McAb的特性鉴定

(1)IgG亚类鉴定：两种McAb都与抗IgG、$IgG_1$抗体发生沉淀反应，与抗$IgG_{2a}$、$IgG_{2b}$和$IgG_3$抗体无反应，表明两者均系$IgG_1$亚类的McAb。

(2)McAb效价及特异性测定。两株细胞的培养上清中抗体效价均为$10^{-3}$；在所生产的小鼠腹水中分别是：$H_1C_2 10^{-6}$，$I_3B_2 10^{-7}$，明显高于培养上清；同时它们只特异地与Vim反应，而与Keratin和NF无反应。

(3)免疫印迹试验两种McAb都在Vim带处形成棕黄色沉淀，与Keratin、NF和GFAP均无反应，表明两种抗体是具有Vim特异性的。

(4)Vim McAb的组织特异性鉴定及初步应用情况是免疫组化染色结果见表1～2及图6～7.①间叶起源的纤维（母）细胞、巨噬细胞、浆细胞、肥大细胞、内皮细胞、软骨细胞、恶纤、骨母细胞瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、恶性黑色素瘤等呈阳性反应；②肝、胰、神经原、神经母细胞瘤、嗜铬细胞瘤、肺鳞癌、胶质瘤等呈阴性反应；③部分非间叶起源的细胞和血管平滑肌细胞、间皮、雪旺氏细胞、部分肾小管上皮、汗腺和表皮等也呈阳性反应。同时，我们发现组织中细胞染色的程度除与抗体效价有关外，还明显受制于细胞的浆/核比、蜡块质量（如固定方法、包埋温度）等。

表1 $H_1C_2$、$I_3B_2$ McAb与部分正常人体细胞的反应

| | |
|---|---|
| 阳性细胞 | 纤维(母)细胞、巨噬细胞、浆细胞、肥大细胞、内皮细胞、软骨细胞、消化道粘膜固有层细胞、壁细胞、血管平滑肌细胞、间皮、雪旺氏细胞、星形胶质细胞、部分肾小管上皮、部分表皮和汗腺。 |
| 阴性细胞 | 肌纤维、神经原、肝细胞、胰腺细胞、肺泡上皮、大多数肾小管上皮、主细胞。 |

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 $H_3C_2$、$I_3B_2$ McAb对部分人体肿瘤的反应

| 肿瘤组织 | 总例数 | $H_1C_2$ McAb | | | $I_3B_2$ McAb | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 检测例数 | 阳性数 | 阴性数 | 检测例数 | 阳性数 | 阴性数 |
| 纤维瘤 | 5 | 1 | 1 | | 5 | 5 | |
| 恶纤 | 13 | 13 | 11 | 2 | / | | |
| 骨母细胞瘤 | 1 | 1 | 1 | | 1 | 1 | |
| 骨肉瘤 | 4 | 2 | 2 | | 2 | 2 | |
| 淋巴瘤 | 4 | 1 | 1 | | 3 | 2 | 1 |
| 恶性黑色素瘤 | 1 | 1 | § | | 1 | 1 | |
| 精原细胞瘤 | 2 | / | | | 2 | 1 | 1 |
| 浆细胞瘤 | 3 | / | | | 3 | 2 | 1 |
| 乳腺梭形细胞癌 | 1 | 1 | § | | 1 | 1 | |
| 滑膜肉瘤 | 2 | 2 | 1 | 1 | / | | |
| 间皮瘤 | 1 | / | | | 1 | 1 | 1 |
| 血管肉瘤 | 2 | / | | | 2 | 1 | |
| 平滑肌肉瘤 | 1 | / | | | 1 | 1 | 3 |
| 卵巢囊腺癌(浆、粘液性) | 4 | 3 | 1 | 2 | 4 | 1 | 11 |
| 肺癌(鳞、腺及小细胞癌) | 16 | 5 | | 5 | 11 | | |
| 肺大细胞癌 | 2 | 1 | | 1 | 1 | 1 | |
| 脑膜瘤 | 2 | 2 | | 2 | / | | |
| 脊索瘤 | 1 | 1 | | 1 | / | | |
| 嗜铬细胞瘤 | 1 | 1 | | 1 | / | | |
| 神经母细胞瘤 | 2 | 2 | | 2 | / | | |
| 胶质瘤 | 2 | 1 | | 1 | 1 | | 1 |
| 听神经瘤 | 1 | / | | | 1 | | 1 |
| 肾透明细胞癌 | 1 | / | | | 1 | | 1 |

注：§：示偶见阳性细胞。

#### 4. 腹水单抗的生产

注入阳性克隆细胞后约2～3周，小鼠腹部高度膨隆，遂收集其腹水及血清。一般2～5ml/只腹水，多呈血性；少数以粉红色实体瘤为主，腹水极少。离心后，－20℃保存。

## 讨 论

晶体细胞中的主要蛋白质是Vim，其次是actin。本研究参考Geisler氏法，以猪眼晶体为材料，提取了Vim。结果表明，用变性剂从晶体中提取Vim时，难于分离的主要杂蛋白是actin，与Geisler氏[13,14]的结果一致；过$DE_{32}$柱后的Ⅱ峰主要是Vim（分子量为52480），其次是actin，不见小分子蛋白；Ⅰ峰含少量Vim及较多杂蛋白(包括actin)，再过$CM_{32}$柱后，actin及大部分小分子蛋白便与Vim分离开了，从而得到较纯的Vim。Vim提取物的重聚实验出现了丝状结构，直径8nm，与 Renner 氏的结果相一致[9]。从分子量和成丝情况看，我们的提取物中主要含Vim。

本文在杂交瘤技术的免疫程序中采用了短程法（H组）和脾内一次注射法（Ⅰ组）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

两者的优点是节省时间和抗原，后者还直接刺激脾内B淋巴细胞，有利于获得较多的免疫淋巴细胞；其不足是易产生IgM型抗体，不能为常规使用的抗小鼠IgG抗体所检测；另外，也具有一定盲目性，其免疫效果要到融合后初筛时才见分晓。从我们的整个实验及鉴定结果看，两种免疫方案都是成功的，比预期的效果好，尤其Ⅰ组，阳性克隆孔较多。融合后的初次筛选，我们采用的是简便、灵敏且可靠的ELISA间接法。在3～5次克隆后，两株细胞均实现了100%的阳性克隆率，从而保证了杂交瘤株的稳定性及抗体的单克隆性，这已为染色体计数、IgG亚类分析等结果所证实。两株细胞的染色体众数均明显超过其亲本细胞，且带有$NS_1$细胞的标记染色体，说明它们是融合产生的杂交瘤细胞；两株细胞产生的抗体都仅与抗IgG、$IgG_1$抗体反应，表明它们都是McAb，同属$IgG_1$亚类；免疫印迹试验结果表明两者均特异地与Vim反应，而与Keratin、GFAP和NF间不存在交叉反应。这些结果表明，我们的两种McAb是Vim特异的McAb。

上述两种Vim McAb的免疫组化鉴定及初步应用情况见表1～2和图6～7。概括而言，起源于间叶组织的正常及恶变细胞大多呈阳性反应，此与Gown等制备的$43\beta E_8$、Osborn等制备的七种Vim McAb以及苏氏制备的Vim多克隆抗体的组化结果一致[4,15,16]。据报道，组化效果明显受制于细胞的浆/核比例，胞浆多即浆/核比例大者，易染色；反之，不易染色，如纤维母细胞相对较成熟的纤维细胞容易染色；淋巴细胞及其瘤细胞胞浆极少，很难染色，尤其在甲醛固定的组织中[1,8]，43βE8就是不能使之染色的一种Vim McAb，当然也不能除外是由McAb的严格特异性所致[16,17]。也正因为如此，在表2中反映出不是每一例应该阳性的肿瘤都能被这两种McAb所染色，如13例恶纤中就有2例未被$H_1C_2$ McAb染色，精原细胞瘤2例中只有1例被$I_3B_2$ McAb染色，其可能原因除细胞浆/核比例较小和McAb的严格特异性外，还包括：1.细胞中Vim的抗原性被破坏。据报道，甲醛固定的组织中，仅63%保存了Vim抗原性[17]；2.Vim抗原决定簇的选择性封闭，从而导致这些细胞难以与相应抗体反应[18]。鉴于上述干扰因素存在，在应用Vim McAb来判断待检细胞中Vim的有无，尤其在下阴性结论时应格外慎重。部分非间叶起源的正常和恶变细胞也呈阳性反应，如血管平滑肌、间皮及其肿瘤、星形胶质细胞等，与van Muijen等的报道一致[1,3,5,17]。这似乎与中间丝分型法的理论基础相矛盾。但据近几年的大量文献报道，Vim与其它中间丝蛋白共存于非间叶起源细胞是一普遍现象，并已从部分这些细胞中分离到了Vim，不少学者正在进一步摸索Vim在它们中的表达规律，以期赋予中间丝分型法以新的意义[5,17]。至于Vim如此广泛存在于非间叶起源的正常及恶变细胞中的机理，目前尚未彻底明瞭。大多数有关研究者认为这是对细胞分化差以及细胞间相互接触作用减弱的一种适应性代偿反应[17]。神经原、肝、胰、神经母细胞瘤、嗜铬细胞瘤、肺鳞癌等均呈阴性反应，这与中间丝分型法的理论基础是一致的。

Vim McAb可为肿瘤的病理诊断进而为其治疗和预后的估计提供信息[17]。仅管已知Vim并非只存在于间叶起源的细胞，但它的表达是有一定规律可循的。最近正陆续出现关于利用Vim与其它中间丝蛋白的共存来对部分细胞的起源进行鉴定如梭形细胞[10]以及将部分正常和肿瘤细胞进一步分类、鉴别的报道[1,17,20]，如血管平滑肌因此被分为三个亚类：（1）只含Des；（2）只含Vim；（3）同时含Des和Vim；星形胶质细胞也被分为两类：①只含GFAP；②同时含GFAP和Vim，并且发现两者存在的部位也有所不同[1]。至于这种分类是否具有真正的生物学意义，尚不清楚；宫内膜癌和宫颈癌都是Keratin阳性的肿瘤，据此不能分辨；

维普资讯 http://www.cqvip.com

但现在发现，前者的大多数还同时表达Vim，而后者则不表达[20]，因而得以区别。因此仅管才始见端倪，我们仍对中间丝分型法的价值抱有信心，相信在深入研究中将会获得更多的新发现。

在本研究中，承汤为学老师、李培然老师及病生、病解、生化教研室、电镜室及摄影室诸位老师的大力支持，特此致谢！

## 参 考 文 献


[1] Osborn M, et al. Lab. Invest. 1983 48:372

[2] 范维珂. 国外医学临床生物化学与检验学分册 1987; 8:1

[3] Gabbiani G, et al. Am. J. Pathol. 1981; 104:206

[4] Gown AM, et al. Am. J. Pathol. 1984; 142:309

[5] Van Muijen GNP, et al. Lab. Invest. 1987; 57:359

[6] Kasper M, et al. Virch. Arch. A 1986; 410:173

[7] Geisler N, et al. FEBS Lett 1981; 125:253

[8] Tsang VCW, et al. Meth. in Enzymol. 1983; 92:377

[9] Renner W, et al. J. Mol. Biol. 1981; 149:285

[10] Bradford M, Anal. Biochem. 1976; 72:248

[11] 胡军，范维珂. 中国免疫学杂志 1987; 3:258

[12] Ramaekers FCS, et al. Proc. Natl, Acad. Sci. USA 1982; 79:3208

[13] Ellis M, et al. Exp. Eye. Res. 1984; 38:195

[14] Ramaekers FCS, et al. Exp. Cell Res. 1980; 127:309

[15] Osborn M, et al. Euro. J. Cell Biol. 1984; 34:137

[16] 苏永新. 中华病理学杂志 1989, 18:30

[17] 周兰，范维珂. 波形蛋白的分子结构、表达及其在病理学中的意义（《免疫学杂志》1989; 6(1):

[18] Franke WW, et al. Exp. Cell Res. 1984; 154:567

[19] Zarbo RJ, et al. Am. J. Surg. Pathol. 1986; 10:741

[20] Dabbs DJ, et al. Am. J. Surg. Pathol. 1986; 10:568


# THE PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND PRELIMINARY APPLICATION OF TWO ANTI-VIMENTIN MCABS

*Zhou Lan et al.*

(Department of Pathophysiology)

BALB/C mice were immunized with Vimentin (Vim) isolated from pig lens. Two hybridoma cell lines (H1C2 and I3B2) continuously secreting anti-Vim McAb (IgG1 subclass)were established by the hybridoma technique. Their chromosome modes are 86 and 90 respectively. The specificity of the two McAbs were tested with immunoblotting and immunohistochemical technique on normal and tumor tissues. The results show that they reacted specifically with Vim in the blot and they are able to stain fibroblasts, fibrocytes, endothelial cells, fibroma, lymphoma, melanoma, etc; but not neuron, liver, pancreas, squamous cell carcinoma of lung, etc. Their uses in the histogenetic classification of normal and tumor tissues are briefly discussed

维普资讯 http://www.cqvip.com



# 兔颈迷走神经传入冲动在大脑皮层的投射分布及针刺效应的观察

生理教研室 陆 杰 S. I. Benns* 王莎莉 罗 勇 黄仲荪

**提 要** 利用电子计算机平均叠加技术在40例家兔上记录到一侧颈迷走神经(CVN)传入冲动投向两侧大脑皮层的躯体-内脏感觉区，并呈现一个范围约为4×4mm²的迷走神经-诱发电位(VEP)中心区。刺激强度由弱到强可以相继使CVN内的不同纤维（$A_\beta$、$A_\delta$和C）兴奋，同时可在皮层上记录到相应的不同传导速度的三类诱发电位即$A_\beta$-VEP、$A_\delta$-VEP和C-VEP。其中$A_\delta$-VEP和C-VEP不被阳极电流阻滞，但可被普鲁卡因浸润所减弱。电针可以抑制这种反映内脏信息的VEP，抑制性质是速升速降的。推测这是针刺和迷走神经两种传入信息在CNS内相互作用的结果

**关键词** 迷走神经-皮层诱发电位（VEP）；平均叠加技术；阳极阻滞；电针

近年来，对迷走神经在心血管、呼吸和腹部内脏器官中的作用已有不少研究，特别是它如何将内脏活动的信息传入中枢的问题日益受到人们的重视。主要由细纤维组成的迷走神经是否能将传导很慢的冲动传入大脑皮层曾有过争论[1][2]。本实验用电子计算机平均叠加技术“普查”了颈迷走神经在皮层上是否有一个投射“中心”，分析了皮层上诱发电位是否与迷走神经中的不同纤维的活动有关，并观察了针刺对迷走神经-诱发电位（Vagal Evoked Potential VEP）的作用。

## 方 法

实验共用家兔40只，体重2.1～3.2kg，雌雄不拘，静脉注射2.5%戊巴比妥钠（1.5ml/kg），气管插管，俯卧位分离一侧（常用右侧）颈迷走神经干，挟伤外周端后在其中枢端神经干上依次安放金属双极刺激电极，Ag-AgCl阻断用电极和引导神经干复合电位的铂丝双极电极。动物头颅在脑定位仪上固定后，开颅暴露一侧（常用右侧）大脑皮层，用直径为0.5mm银球电极引导皮层电位，参考电极置于附近头皮上。皮层表面和迷走神经干用温石蜡油覆盖。肛温维持在37℃左右。

用单一方波电脉冲刺激颈迷走神经向中端，按需要用不同强度以引起神经干中不同性质的纤维兴奋，同时记录颈迷走神经干的复合动作电位（Vagal Action Potential, VAP）和迷走神经-大脑皮层诱发电位，VEP经放大后转入双线DISA-14A21型肌电仪的储存系统监视，并经SMUP-A型生物信号处理系统（上海医科大学）平均叠加10—40次后用打印绘图仪描记。并参照Zimmermann氏法[3]用150—300μA阳极电流阻断迷走神经干中粗纤维的传导，用1～2% Procaine局部浸润神经干以消除细纤维的传入活动，在此基础上分别观察

* S. I. Benns为英国伦敦大学博士后研究生

**KEY WORDS** Vimentin, Hybridoma technique, McAb, Immunoblotting, Immunohistochemical technique, Pathologic diagnosis of tumors