DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.009
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001


文章编号:1000-5404(2001)10-1149-04

论著

# 波形蛋白在大鼠大脑穿刺损伤后的表达研究

林江凯,蔡文琴 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察波形蛋白(Vimentin, Vim)在脑穿刺损伤后的动态变化,探讨Vim在脑胶质瘢痕形成中的作用。方法 应用大鼠脑顶叶刺伤模型。动物分为4组:对照组,脑穿刺损伤3 d及1、4周组。行Vim免疫组织化学染色、Vim阳性细胞的流式细胞计数和RT-PCR半定量。结果 3 d时Vim免疫反应阳性细胞从伤道周围到伤道较远距离,表现为不同程度的增生和肥大,较正常的星形胶质细胞数量明显增多,且胞体增大,突起增多、延长,染色加深。1周时Vim上述变化进一步加强,4周即见伤道周围形成胶质瘢痕,大量突起相互交织成网状;刺伤后的Vim的阳性细胞数和mRNA增加。结论 脑损伤后Vim在核酸、蛋白和细胞水平均增加,Vim可能在胶质瘢痕的形成中起重要作用。

关键词:波形蛋白;胶质化;脑损伤;中枢神经系统;大鼠
中图法分类号:R341;R394.3;R651.15 文献标识码:A

# Expression of vimentin in rat cerebrum after stab wound

LIN Jiang-kai, CAI Wen-qin (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To investigate the dynamic changes of vimentin (Vim) after brain injury and explore the effect of vimentin (Vim) on the formation of glial scar. Methods Model of rat with brain stab wound on parietal lobe was used. All rats were randomly divided into 4 groups, group of normal control and 3 d, 1 week and 4 weeks after injury. The rats were sacrificed at different time points. Immunohistochemical, flowcytometry technique (FCM) and RT-PCR analysis were used to detect the Vim expression. Results Most Vim(+) cells with hypertrophy and hyperplasia were located in regions around wound site at 3 d after injury and the gliosis more significant at 1 week after injury, a lot of cell bodies and interwined prominencies in glial scar at 4 weeks after injury. Number of Vim(+) cell increased under the FCM detection and the vim mRNA raised as detected by RT-PCR. Conclusion Vim may play an important role in the formation of glial scar.

**Key words**: vimentin; gliosis; brain injury; CNS; rat

反应性胶质化是一种常见的神经病理变化过程,它发生于几乎所有类型的脑损伤后[1]。其病理表现为胶质细胞胞核、胞体和突起肿胀,胶质细胞增生甚至肥大。一般认为,反应性胶质化的过程是胶质细胞维持微环境稳定的过程。但持续的胶质化(刺激强烈或反复、持续出现)将导致胶质瘢痕形成。长期以来胶质瘢痕被认为是轴突再生的主要障碍之一[2]。迄今,有关胶质化和胶质瘢痕的机制仍不清楚。

Vim是胶质细胞表达的主要中间丝之一,正常时多在胚胎期和出生后约2周存在,以后这些曾在胶质细胞广泛表达的中间丝的表达很低。相反,胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达增加,该过程被称为转换。成年时波形蛋白仅在少数细胞内表达,如放射状胶质、小脑博格曼胶质。但在各种刺激后出现波形蛋白的重新表达,尤其是反应性胶质化时明显增强。以往的研究多注意GFAP的表现,认为GFAP的过度表达是反应性胶质化及最终形成胶质瘢痕的重要原因,而对Vim的研究不够深入。本研究利用大鼠大脑刺伤模型,应用免疫组织化学,结合RT-PCR、流式细胞技术,观察在脑穿刺损伤后伤道周围中间丝Vim的变化,为研究Vim在脑胶质化及胶质瘢痕中的作用与意义打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

流式细胞计数仪(Elite. ESP),PCR仪(AMPLITRON® Ⅱ. Thermolyne),UVP凝胶成像系统(Model: GDS7600S)。鼠抗Vim单抗(中山公司分装);SABC免疫组化试剂盒和FITC标记鼠抗IgG公司(Poster)。

### 1.2 动物与分组

Wistar大鼠,28只,体重180~200 g,雌雄不拘,随机分成正常对照组,脑穿刺损伤3 d,1、4周组,每组7只。

### 1.3 动物模型制作

1%戊巴比妥钠腹腔注射(30 mg/kg)麻醉后,固定于立体定位架上,剪毛,常规消毒,沿正中切开头皮,分离骨膜,暴露右侧顶骨,电钻开颅(部位:前囟后4 mm,中线旁2.5 mm),骨孔直径2 mm。将自制刀片(长70 mm,宽1.5 mm,厚0.3 mm)固定于螺旋推进器上,缓慢将刀片垂直刺入顶叶皮质下脑组织中5 mm,留针2 min后退出刀片,缝合头皮,制成脑损伤模型。对照组仅开颅,不致伤。

基金项目:全军"九五"面上项目(96M090)
作者简介:林江凯(1964-),男,湖北省浠水县人,博士,主治医师,讲师,主要从事胶质细胞与神经再生的关系方面的研究,现在附属西南医院神经外科。电话:(023)68754000-73071
收稿日期:2000-12-30;修回日期:2001-06-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

### 1.4 免疫组化染色

按规定时间麻醉动物，4% 多聚甲醛＋30% 苦味酸灌注固定，常规取材，4 ℃后固定 4 h，25% 蔗糖浸泡 24 h 后冰冻切片。用鼠抗 Vim 单抗行免疫组化染色(SABC 法)。

### 1.5 单细胞悬液制备及免疫荧光染色

麻醉动物后，活杀取脑，去软脑膜，锐利刀片紧邻伤道周围组织取材，D-Hanks 液漂净血迹，剪碎组织，0.25% 胰酶 37 ℃消化 30 min，反复吹打成单细胞悬液，终止胰酶消化，200 目滤网过滤细胞，10 mmol/L PBS 漂洗，800 r/min 离心 10 min，共 2 次，1% Triton 30 min，10 mmol/L PBS 漂洗 5 min，调整细胞数为 $1\times10^5$/ml 后，加 Vim 单抗，37 ℃孵育 1 h 后转 4 ℃过夜；10 mmol/L PBS 漂洗 5 min，3 次；加 FITC 标记抗鼠 IgG，37 ℃孵育 30 min，10 mmol/L PBS 漂洗 5 min，3 次，荧光显微镜镜检，确认免疫荧光染色成功后，再次调整细胞密度为 $1\times10^5$/ml 后，上流式细胞仪检测。

### 1.6 RT-PCR

1.6.1 总 RNA 的提取 将紧邻伤道的皮质 100 mg，置 TriPure 内，按说明书提取，紫外分光光度计法定量。

1.6.2 逆转录 采用 Promega 公司 AMV 逆转录试剂盒，按照产品介绍法将总 RNA 的 mRNA 逆转录成 cDNA。20 μl 反应体系中含变性的 RNA 模板 1 μg、5× buffer 4.0 μl、25 mmol/L $MgCl_2$ 4.0 μl、10 mmol/L dNTP 混合物 2.0 μl、$Olig(dT)_{15}$ 2.0 μl、$ddH_2O$ 5.0 μl，混匀，68 ℃水浴 5 min，室温放置 15 min 后，加入 RNasin(70 U/μl) 1.0 μl、AMV 逆转录酶(400 U/μl) 1.0 μl，混匀后，42 ℃温育 1 h。取出后 99 ℃变性 5 min，置 4 ℃ 5 min，即可用于 PCR 或－70 ℃保存备用。

1.6.3 PCR 按 Primer 引物设计软件设计的大鼠 Vim 引物(Sangon 公司)序列为：Sense 5'-CGT TTC CAA GCC TGA CCT CAC C-3'，Antisense 5'-GCC ATC TTT ACA TTG AGC AGG T-3'；同时设β-actin 阳性产物作为 PCR 内对照，β-actin 引物序列为：Sense 5'-CCT TCC TTC CTG GGC ATG GAG TCC TG-3'，Antisense 5'-AGG AGC AAT GAT CTT GAC TTC-3'，BLAST 行同源分析，Vim、β-actin 扩增片段长度分别为 392、165 bp。

PCR 条件：25 μl 反应体系中含 cDNA 2 μl，10× PCR buffer 2.5 μl，15 mmol/l $MgCl_2$，4 种 dNTPs 各 25 μmol/L，每次加两对引物，即目的基因引物与β-actin 引物(内对照)各 50 pmol/L 及 1 U Taq DNA 多聚酶，反应在 PCR 仪中进行。94 ℃预变性 5 min，94 ℃ 1 min，54 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，35 个循环后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物鉴定及定量分析：PCR 产物用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳，加入终浓度 1 μg/ml 的 EB，以 PCR 标准分子量 Marker 为参照，电泳完毕后在紫外灯下观测照相，并将凝胶置凝胶电泳扫描分析系统，以β-actin 作为内对照，根据目的片段 Vim 与β-actin 的比值判断各组中目的基因的表达与含量变化。

### 1.7 统计学处理

采用 Excel 2000 统计程序对数据进行统计分析。对流式细胞仪计数结果作 $\chi^2$ 检验，对图像分析结果作两均数差异的 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 免疫组化染色结果

正常成年大鼠大脑 Vim 仅在室管膜细胞和伸展细胞内表达。

脑刺伤后皮质、胼胝体、海马的伤道周围出现 Vim 免疫反应阳性细胞，细胞胞浆和突起均着色，阳性细胞出现的范围在伤道附近。3 d 时 Vim 免疫反应阳性细胞在伤道周围，表现为不同程度的增生和肥大。即较正常的星形胶质细胞数量明显增多，且胞体增大，突起增多、延长，染色加深。1 周时 Vim 上述变化进一步加强，4 周见伤道周围形成胶质瘢痕，大量突起相互交织成网状，见图 1～4。

### 2.2 流式细胞计数结果见表 1

表 1 不同时间点 **Vim** 阳性细胞的流式细胞计数结果(%)

**Tab 1 Vim positive cell count by flow cytometry** (%)

| | Control | 3 d | 1 week | 4 weeks |
|---|---|---|---|---|
| Vim(＋)cell | 16.3 | 51.2** | 63.7** | 56.5** |

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

### 2.3 RT-PCR 分析结果见表 2

表 2 不同时间点 **Vim RT-PCR** 凝胶图像分析结果($\bar{x}\pm s$)

**Tab 2 Vim RT-PCR analysis at time points**($\bar{x}\pm s$)

| | Control | 3 d | 1 week | 4 weeks |
|---|---|---|---|---|
| IOD (Vim/β-actin) | 0.02±0.01 | 0.32±0.10** | 0.28±0.04* | 0.39±0.12* |

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

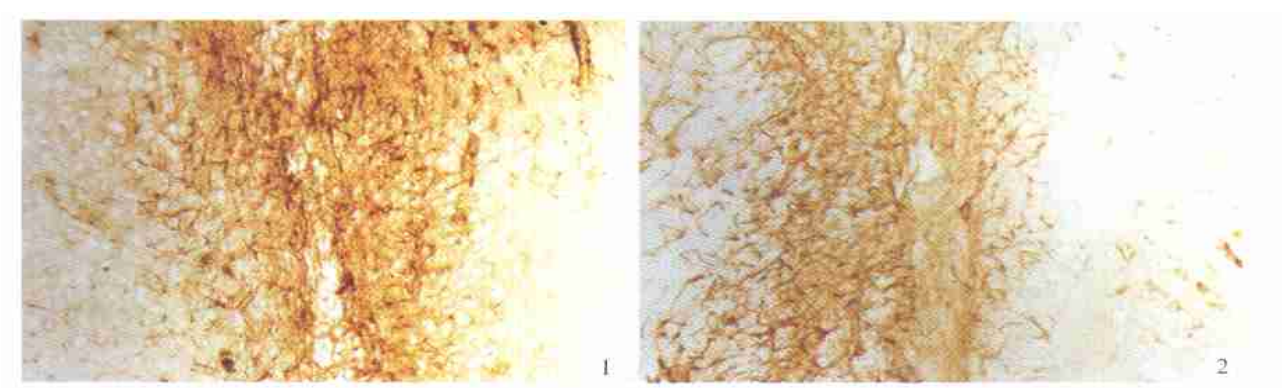


图 1 皮质刺伤后 1 周紧邻伤道大量 **Vim** 阳性细胞出现 (SABC× 200)

**Fig 1 Many Vim positive cells around the wounded tract 1 week after stab wound of cortex** (SABC× 200)

图 2 皮质刺伤后 4 周 **Vim** 阳性细胞网状交织成瘢痕 (SABC× 200)

**Fig 2 Vim positive cells interwined to form scar 4 weeks after stab wound of cortex** (SABC× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

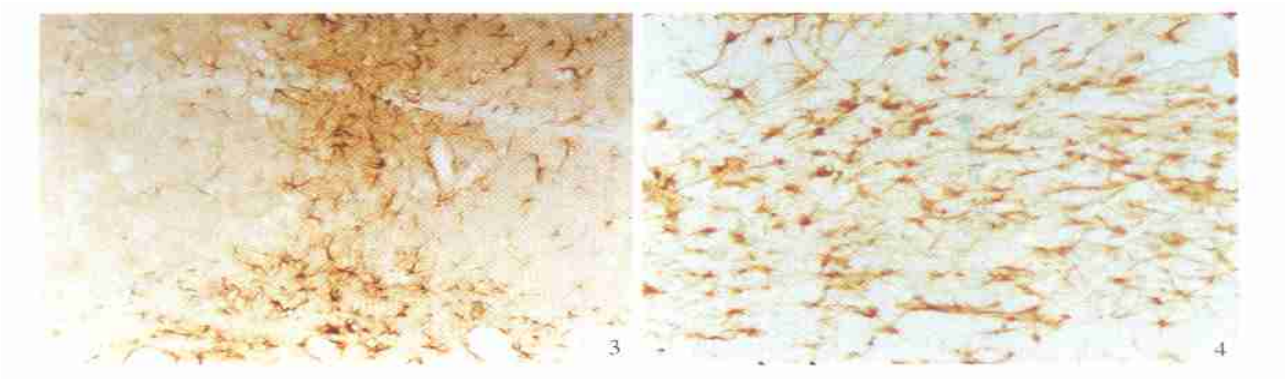


图 3　海马刺伤后 1 周紧邻伤道大量 Vim 阳性细胞出现　(SABC× 200)

**Fig 3　Many Vim positive cells around the wounded tract 1 week after stab wound of hippocampus**　(SABC× 200)

图 4　海马皮质刺伤后 4 周 Vim 阳性细胞网状交织成瘢痕　(SABC× 200)

**Fig 4　Vim positive cells interwined to form scar 4 weeks after stab wound of hippocampus**　(SABC× 200)

## 3　讨论

### 3.1　脑穿刺伤后 Vim 大量表达

本研究发现, 伤道周围出现大量的 Vim 免疫组织化学阳性细胞。在观测的时间点内持续存在, 出现反应性胶质化最显著的时间在伤后 1 周左右, 4 周 Vim 阳性细胞数少于 1 周的原因可能是: ①表达 Vim 的小胶质细胞减少; ②致密瘢痕中的星形胶质细胞相对较难制备成单细胞悬液。Kharlamov[3] 利用光化学致大鼠顶叶新皮质损伤, Vim 阳性细胞大量出现的时间为伤后的 3～7 d。在核酸水平上, 我们利用 RT-PCR 显示损伤后 Vim 的 mRNA 亦显著增加。

### 3.2　Vim 表达的范围及意义

星形胶质细胞是反应性胶质化涉及的主要细胞。CNS 的不同部位损伤发现, 损伤后的一定时间和范围内, 作为两种主要中间丝之一的 GFAP 在反应性星形胶质细胞内显著上调, 另一主要中间丝 Vim 重新出现。而正常的成熟星形胶质细胞一般不表达 Vim, 仅在少数细胞如博格曼胶质、放射状胶质内表达。提示 Vim 在反应性胶质化中可能有重要作用, 两种中间丝之间可能存在一定的联系。

进一步的分析发现, Vim 表达的范围限于伤道周围, 与 GFAP 的表达存在差异, 既往大量的研究表明, GFAP 在正常成年大鼠即有较高水平的表达, 损伤后的表达增加, 但影响的范围可达离损伤较远部位, 甚至累及对侧大脑半球。后期胶质瘢痕的形成往往位于伤道周围, 也就是说, Vim 增加的范围与后期形成的瘢痕更加吻合。提示 Vim 作为反应性胶质化的指标较 GFAP 更特异, 我们的观察结果与 Lenz[1] 报告的观点一致, 该作者认为正常成年啮齿类 Vim 的表达仅限于特殊胶质, Vim 是比 GFAP 更特异的胶质化标志。设想阻断 Vim 的表达能否减轻反应性胶质化, 甚或干扰 GFAP 丝状网络, 进而减缓胶质瘢痕的形成, 为轴突再生创造时机。这也是我们研究 Vim 与胶质瘢痕关系的主要出发点之一。

### 3.3　Vim 阳性细胞的组成和来源

Vim 阳性细胞的组成大部分与 GFAP 的来源相同, 即星形胶质细胞。这些星形胶质细胞大致又有两种来源, 一是所谓的静息星形胶质细胞, 该细胞受到刺激后被激活, 成为反应性星形胶质细胞, 或原位分裂成新的星形胶质细胞[4], 这两类细胞可能占大多数, Miyake[5] 用 $^{3}$H 胸嘧啶标记法发现, 皮质增生的 GFAP 阳性星形胶质细胞只占总 GFAP 阳性细胞的大约 17%, 增生的 Vim 阳性细胞的比例可能与此相当; 另一种来源可能是神经干细胞或神经前体细胞[6], 在损伤时的内环境下, 定向分化成星形胶质细胞。Mikucki[7] 利用双标免疫荧光发现, 少数 Vim 阳性细胞不表达 GFAP, 这些细胞可能是激活的小胶质细胞和内皮细胞或炎性细胞。既然 Vim 主要在发育时表达, 在成年时正常表达的细胞如放射状胶质、室管膜细胞等具有促进神经再生的功能或神经干细胞的特征, 因此, Vim 阳性细胞的出现可能作为胶质细胞增殖的标志之一。

### 3.4　Vim 的调节机制

脑损伤后, 小胶质细胞的激活先于星形胶质细胞的激活, 激活的小胶质细胞分泌大量的炎性介质如 IL-1、TNF-α 等; 同时, 局部的血脑屏障破坏, 血液中的巨噬细胞、中性粒细胞浸润, 同样释放各种炎性分子[8]; 稍后激活的星形胶质细胞本身释放多种生长因子如 NGF、EGF、PDGF、MBP、VEGF 和营养因子如 CNTF[9]。这些因子通过星形胶质细胞的信号系统, 调节涉及胶质反应的包括 Vim 在内的多种蛋白表达和神经元及星形胶质细胞的有丝分裂[10]。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献：

[1] Lenz G, Manozzo L, Gottardo S, *et al*. Temporal profiles of the in vitro phosphorylation rate and immunocontent of glial fibrillary acidic protein (GFAP) after kainic acid-induced lesions in area CA1 of the rat hippocampus: demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis[J]. Brain Res, 1997, 764(1—2): 188—196.

[2] Stichel C C, Muller H W. The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier[J]. Cell Tissue Res, 1998, 294(1): 1—9.

[3] Kharlamov A, Kharlamov E, Armstrong D M. Age-dependent increase in infarct volume following photochemically induced cerebral infarction: putative role of astroglia[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2000, 55(3): B135—141.

[4] Horner P J, Power A E, Kempermann G, *et al*. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord[J]. J Neurosci, 2000, 20(6): 2 218—2 228.

[5] Miyake T, Hattori T, Fukuda M, *et al*. Quantitative studies on proliferative changes of reactive astrocytes in mouse cerebral cortex[J]. Brain Res, 1988, 451(1—2): 133—138.

[6] Johansson C B, Momma S, Clarke D L, *et al*. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system[J]. Cell, 1999, 96(1): 25—34.

[7] Mikucki S A, Oblinger M M. Vimentin mRNA expression increases after corticospinal axotomy in the adult hamster[J]. Metab Brain Dis, 1991, 6(1): 33—49.

[8] Ransohoff R M, Tani M. Do chemokines mediate leukocyte recruitment in posttraumatic CNS inflammation[J]? Trends Neurosci, 1998, 21(4): 154—159.

[9] Winter C G, Saotome Y, Levison S W, *et al*. A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(13): 5 865—5 869.

[10] Acarin L, Gonzalez B, Castellano B. STAT3 and NFkappaB activation precedes glial reactivity in the excitotoxically injured young cortex but not in the corresponding distal thalamic nuclei[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2000, 59(2): 151—163.

（编辑 薛国文）

# 个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)10-1152-01

## 高压氧治疗坐骨神经损伤 1 例

## Report a case of sciatic-nerve injury treated by hyperbaric oxygen

郝玉通，王亚平，徐宏萍，徐晓青，吴晓东 （第三军医大学附属新桥医院高压氧科，重庆 400037）

患者，男性，4 岁。于 2000 年 4 月在当地一家诊所进行肌肉注射，违反配伍禁忌，将中西药针剂混合注射后几分钟出现右侧下肢麻木，行走困难，注射部位红肿疼痛。14 d 后经重庆医科大学儿童医院检查：右侧下肢肌力明显减弱为Ⅲ⁻级，肌张力减弱，右大腿肌周径小于对侧 0.5～1 cm，病理征阴性。B 超示：右髋关节腔积液。EMG 示：神经传导速度右胫腓神经波幅明显降低。经儿童医院治疗，给予营养神经，抗炎；并行右侧坐骨神经探查缓解术，术中见右坐骨神经被膜增厚与神经粘连压迫坐骨神经，局部筋膜增厚、水肿。来我科就诊时患儿跛行比较严重，基本以左侧下肢为支撑腿，拖动右腿行走，伤口疼痛较明显，足不能背屈，足跟行走困难，右下肢肌力为Ⅲ⁻级，肌张力较左侧低，膝腱反射差，肌肉轻度萎缩，右下肢坐骨神经臀点、跟点均有压痛，小腿外侧、足背感觉减弱。

治疗情况：根据患者当时病情，我们采取的治疗方案为：0.2 MPa 面罩吸氧，加压 15 min，稳压 70 min，减压 16 min，每日进行一次。第一个疗程第 5 次时患儿自述疼痛明显减轻，行走较以前有较大改观，故继续进行高压氧治疗，共做高压氧治疗 30 次，患儿右下肢功能基本恢复，可以正常行走、跑跳，右侧肌力恢复到Ⅴ⁻，肌张力正常，腱反射正常存在。EMG 示：神经传导速度及波幅正常。

### 讨论

急性坐骨神经损伤大多数为医源性，目前尚无统一的治疗方法。李之芳[1]报告高压氧治疗可促进神经轴突和髓鞘的修复。根据患儿情况，我们考虑属于急性周围神经损伤，单神经病，因周围神经纤维的再生能力比较强，患儿在受伤后及时的进行了手术缓解，故受损神经的胞体应该比较完整，功能较好，故可以再生。高压氧可以迅速纠正病损区域的缺氧状态，减少病损区域的淤血，加速对病灶的清除，使组织有氧氧化增强，无氧酵解减弱，细胞内和组织间水肿减轻，另外高压氧治疗可以加速受损神经的远段华勒变性、近段支芽生长速度，加速受损效应器、运动终板的修复，加速髓鞘的修复。从我们的治疗效果来看，效果满意，可见高压氧是一种治疗坐骨神经损伤的有效疗法。

关键词：高压氧；坐骨神经损伤
中图法分类号：R651.305.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] 李之芳. 高压氧对周围神经损伤修复后再生促进作用的研究[J]. 北京红十字朝阳医院院刊, 1990, 17: 65—67.

（编辑 陈聪连）

作者简介：郝玉通(1975—)，男，河北省张家口市人，医师，主要从事高压氧的临床应用方面的研究。电话：(023)68755640

收稿日期：2000-07-15；修回日期：2000-09-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net