doi:10.11659/jjssx.08E016058

·基础研究·

电击死心脏窦房结组织纤维连接蛋白的表达

李贵花[1,2],王 星[1],刘德斌[3],李志军[1],张少杰[1] (1.内蒙古医科大学解剖学教研室,内蒙古 呼和浩特 010059;2.内蒙古医科大学研究生学院,内蒙古 呼和浩特 010059;3.内蒙古自治区人民检察院技术处,内蒙古 呼和浩特 010050)

[摘 要] **目的** 通过研究电击死心脏窦房结组织中纤维连接蛋白(Fibronectin,Fn)的蛋白水平,为电击死的诊断及死亡时间鉴定提供新的理论依据。**方法** 采用免疫组化技术(SP法)检测电击死亡人窦房结15例(人电击组)、重度颅脑损伤人窦房结15例(人对照组)、电击死亡兔窦房结35例(兔电击组分7组:0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h)和断颈处死兔窦房结35例(兔对照组分7组:0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h)的Fn蛋白表达水平。**结果** 人电击组Fn阳性表达率为100%,有强弱之分;人对照组Fn阳性表达率为6.67%,组间差异有极显著性统计学意义($P<0.01$)。兔电击组电击后即刻(0 h)就有Fn表达,与兔对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);电击后3 h、6 h至12 h Fn表达分布越来越广泛,与兔对照组比较差异有极显著性统计学意义($P<0.01$);Fn表达在电击死后24 h逐渐下降,至电击死后48 h仍与兔对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而阴性对照组则未见类似改变。**结论** 电击使窦房结Fn表达明显增强,并且随着死亡时间的延长窦房结Fn蛋白阳性表达的光密度值呈规律性变化,可为法医学电击死诊断和死亡时间的鉴定提供新的理论参考依据。

[关键词] 电击死;窦房结;纤维连接蛋白;免疫组织化学

[中图分类号] R329.4;R361+.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-08-16

Expression of fibronectin protein levels in sinoatrial node tissues of hearts following electrocution

LI Gui-Hua[1,2],WANG Xing[1],LIU De-bin[3],LI Zhi-jun[1],ZHANG Shao-jie[1] (1. Department of Anatomy,Inner Mongolia Medical University,Hohhot Inner Mongolia 010059,China;2. Graduate School,Inner Mongolia Medical University,Hohhot Inner Mongolia 010059,China;3. Department of Technology,People's Procuratorate of Inner Mongolia Autonomous Region,Hohhot Inner Mongolia 010050,China)

Abstract: Objective To study the protein levels of fibronectin (Fn) in the sinoatrial node tissues of hearts caused by electric shock death,and to provide a new theoretical basis for the diagnosis of electric shock death and the identification of death time. **Methods** Using immunohistochemical technique(S-P method) to detect protein levels of 15 cases of human sinoatrial node following electrocution(human experimental group), 15 cases of human sinoatrial node with severe traumatic cerebral injury(human control group),35 cases of rabbit sinoatrial node following electrocution(rabbit experimental group,divided into 7 groups according to different sampling time: 0 h,1 h,3 h,6 h,12 h,24 h,48 h),and 35 cases of rabbit sinoatrial node with broken neck executed(rabbit control group,divided into 7 groups according to different sampling time:0 h,1 h,3 h,6 h,12 h,24 h,48 h). **Results** Fn positive expression rate in human experimental group was 100% while it was 6.67% in the human control group,and the differences were statistically significant($P<0.01$). The Fn expression can be seen after electric shock immediately in the rabbit experimental group,and there was statistical difference compared with the rabbit control group ($P<0.05$). Distribution of Fn expression became more and more widely after 3 hours to 12 hours in the rabbit experimental group,and there was significant difference compared with the rabbit control group($P<0.01$). The Fn expression began to decrease 24 hours after electrocution, and it still had statistical significance 48 hours after electrocution compared with the rabbit control group($P<0.05$). **Conclusion** Electric shocks significantly enhanced the expression of Fn protein levels in the sinoatrial node tissues, and optical density of Fn positive expression has a regularity change along with the extended time of death. These results could provide a theoretical reference basis for forensic diagnosis of electrocution and identification of death time.

Keywords: electrocution;sinus node;fibronectin;immunohistochemistry

电击死的法医学鉴定主要集中于电击局部的组织改变,通常以电击部位的特征性损伤作为鉴定的依据。但相关统计指出,在220 V电压所致电击伤(死)中,只有大约1/3的案例出现相对典型的皮肤电流斑[1],其他不典型的电击死,如水中电击死,就不能产生典型电流斑[2-3],所以其应用价值也受到一定限制。国内外许多学者尝试从不同角度寻找电损伤的鉴定依据,如从电击死后的各个组织器官的形态学以及分子水平的变化等方面已有了大量的研究[4-7];目前国内已有从分子生物学角度出发的研究,为电击死的诊断提

[基金项目] 国家自然科学基金(81260269;81560348)

[通信作者] 李志军,E-mail:lizhijunmail@sina.com

供了新的依据[8-10]。但在实际工作检查中,法医工作人员对其诊断,尤其是对无电流斑的死因推断仍没有统一的参照依据和直接客观的特异性指标,对电击工具的推断、生前和死后电击的鉴别以及电击死后死亡时间的判断都相当困难,因此,这一直是法医学研究的热点。毕海涛[11]在早期心肌缺血死后诊断的法医学应用研究中指出,Fn 在保存环境不同及福尔马林固定时间有差异的情况下,对急性心肌缺血免疫组织化学诊断指标的影响相对比较恒定,对 Fn 的研究在法医鉴定中有较大价值。目前有关电击死所致窦房结 Fn 变化的研究较少。本研究对电击死的心脏和长耳兔传导系统窦房结 Fn 的免疫组化表达进行研究,以期为电击死的鉴定提供新的可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

自制电击装置,TS-12E 全自动脱水机(湖北孝感电子仪器厂),Leica EG-1160 包埋机(德国徕卡公司),Leica RM-2135 切片机(德国徕卡公司),恒温培养箱(PYX-DHS)(上海跃进医疗器械厂),Leica 免疫组化染色机(德国来卡公司),医用微波炉 LG2011TW(中国),Olympus-B20 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),Olympus 图象分析软件(日本 Olympus 公司),数码照相机(500 万像素)(日本 Oylmpus 公司)。Fn 免疫组织化学 S-P 试剂盒(博士德),鼠抗人 Fn 单克隆抗体(博士德),DAB 显色剂即用型(北京中杉生物技术公司),中性福尔马林液 (北京中山生物试剂有限公司),DEPC(北京中山生物试剂有限公司),多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine)(北京中山生物试剂有限公司),0.01M枸橼酸盐缓冲液(pH = 6.0)(北京中山生物试剂有限公司),0.1M PBS 液(pH = 7.4)(北京中山生物试剂有限公司)。

1.2 样本来源

1.2.1 尸体样本 选取 2008 年至 2012 年内蒙古自治区人民检察院技术处法医病理实验室病例 30 例。其中 15 例具备电击损伤的 3 个条件,即带电电源、通过人体的电流通路及人体接触地面,为法医病理实验室确证电击死亡案例设为试验组;重度颅脑损伤致死案例 15 例(无心脏疾患)设为对照组。

1.2.2 实验动物分组与动物模型建立 健康成年日本大耳白 70 只,电击组 35 只,非电击阴性对照组 35 只,雌雄不限,体质量 2.5 ~ 3.0 kg,中山大学动物实验中心提供。以上动物按照死后取材时间差异各分为 7 个组:电击组(0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h),其中电击组电击后即刻(0 h)就有 Fn 表达;非电击阴性对照组(0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h)。电击组是在 220 V 交流电源的两端分别接一个金属夹,金属夹分别直接夹住兔左前肢和右后肢靠近踝关节毛稀少的地方[12];阴性对照组采用断颈处死。模型建立后分别在相应的时间采用宋一璇等[13]建立的取材方法取窦房结及其周围组织,所取组织一分为二,一份窦房结组织快速生理盐水冲洗后迅速冻入液氮中备用,另一份放置于4%的中性甲醛溶液固定,24 h 后石蜡包埋、切片,分别进行 HE 和免疫组织化学染色。行连续切片,每一切面取 5 张,用 SP 免疫组化法检测 Fn 表达[12]。

1.3 HE 染色

1.3.1 载玻片和盖玻片的处理 载玻片用酸液浸泡 24 h 以后,经自来水洗涤和蒸馏水水洗,再由 90% 乙醇浸泡 24 h,最后用绸布擦干净。载玻片用明胶液在 60 ℃ 条件下处理,置 37 ℃ 过夜烤干以备用。用 0.25% 盐酸/酒精浸泡盖玻片,绸布擦干后备用[14]。

1.3.2 石蜡包埋-HE 染色 中性福尔马林液固定:固定 24 h 后,应用 TS-12E 全自动脱水机将心脏标本脱水,常规石蜡包埋,切片(切片厚 5 μm),将玻片放入烤箱中烤片(60 °C,24 h)后置室温下备用。切片脱腊水化:切片先后置于两缸二甲苯(Ⅰ和Ⅱ)脱蜡(各 20 min),后依次入无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇(各 5 min),蒸馏水冲洗切片 2 次(各 5 min)。HE 染色:将脱蜡水化的切片依次浸入 Harris 苏木素液(5 min)、酸化伊红乙醇(1 min),脱水后封片。

1.4 免疫组化

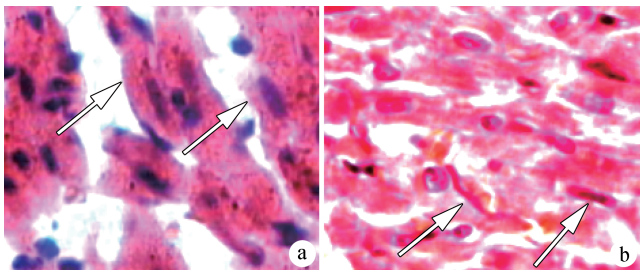
按常规免疫组化方法[14],依照说明书将已固定好的标本中的固定液弃掉,固定组织由流水冲洗 5 h,然后梯度酒精脱水,接着透明、浸蜡、包埋后,切片机切片,最后用 SP 试剂盒对备好的切片进行免疫组化染色。在免疫组化实验中,以不加第一、二抗体进行免疫组化染色的切片作为阴性对照。棕黄色表示阳性信号,蓝色为阴性信号。

2 结果

2.1 人窦房结组织 HE 染色结果

实质细胞位于纤维组织形成的网架中,从中心区到周边区排列逐渐整齐,渐趋于平行。窦房结的中央区和窦房结动脉的外周 P 细胞多见,头部较多,在外周带也可见成团状分布的 P 细胞。电击组 P 细胞边界模糊,空泡及散在的细胞核固缩在部分胞质可见(图 1a)。非电击阴性对照组的 P 细胞短小,HE 染色 P 细胞横切呈圆形,斜切呈椭圆形,纵切呈圆柱形、短

梭形或短杆形,略有弯曲(图 1b)。P 细胞胞质淡染,横纹不清晰,胞核位于细胞中央,呈卵圆形或短棒状,核横径与细胞直径几乎相等。



箭头:P 细胞

a:人电击组;b:人对照组

图 1 人窦房结 HE 染色(×400)

2.2 人窦房结组织 Fn 免疫组化结果

窦房结中观察电击组阳性颗粒染色为棕黄色,横切面上阳性颗粒为较均质散在分布,纵切面上阳性颗粒为不均质分布,与细胞长轴多平行。电击组 Fn 强阳性 2 例,阳性 7 例,弱阳性 6 例,阴性 0 例,非电击阴性对照组弱阳性1例,阴性14例。电击组Fn阳性表达率为 100%,但有强弱之分。对照组 Fn 阳性表达率为 6.67%。经 χ^2 检验,二者差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$),见表 1。

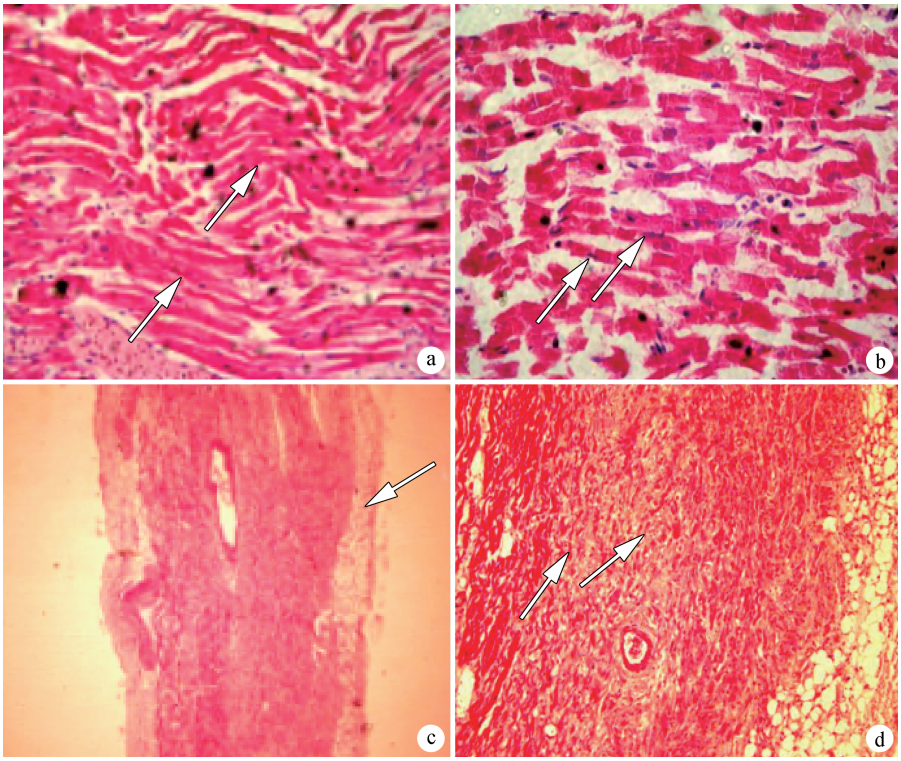
2.3 兔窦房结组织 HE 染色结果

电击组电击后 1~6 h 见窦房结组织灶性凝固性坏死,细胞核深染、扭曲,有的核伸长,部分 P 细胞断裂;间隙增宽、水肿,部分区域可见散在出血,伤后 12~24 h,窦房结变性坏死的范围扩大,P 细胞呈不同程度溶解状态,有的核消失或固缩更加明显(图 2a、b),P 细胞扭曲、核浓缩,间质水肿,部分细胞核溶解消失。非电击死组呈正常染色状态,无变性坏死,P 细胞不发生断裂,核形态正常。图 2c、d 箭头示正常 P 细胞。

表 1 人电击组与非电击组 Fn 阳性表达率比较(%)

组别	阴性(-)	弱阳性(+)	阳性(++)	强阳性(+++)
电击组	0(0.00)	6(40.00)*	7(46.67)*	2(13.33)*
非电击组	14(93.33)	1(6.67)	0(0.00)	0(0.00)

*:与非电击组比较,$P<0.05$



箭头:P 细胞

a:兔电击组窦房结(×100);b:兔电击组窦房结(×200);c:兔对照组窦房结横断面(×40);d:兔对照组窦房结横断面(×100)

图 2 兔窦房结 HE 染色

2.4 兔窦房结组织 Fn 免疫组化结果

电击组 Fn 广泛表达于受损的细胞胞质和胞膜,呈均匀的棕黄色,而对照组细胞呈阴性。电击后即刻(0 h)就有 Fn 表达,可见 Fn 表达于呈灶状分布,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.01$);电击后 3 h、6~12 h Fn 表达分布越来越广泛,且其光密度质越来

越高,与对照组比较差异具有极显著性统计学意义($P<0.01$)。至电击死后 24 h Fn 表达逐渐下降,至 48 h 其光密度值与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。阴性对照组则未见类似改变,见表 2、图 3。

表 2 电击死不同时间窦房结细胞纤维连接蛋白(Fn)的免疫组化表达灰度值($\bar{x}\pm s$)

时间段	兔对照组	兔电击死组
0 h	阴性(-)	101.81 ±7.12*
1 h	阴性(-)	105.43 ±8.62*
3 h	阴性(-)	109.05 ±9.03*
6 h	阴性(-)	110.24 ±9.78*
12 h	阴性(-)	116.45 ±11.24*
24 h	阴性(-)	108.47 ±7.58*
48 h	阴性(-)	106.35 ±7.24*

*:与对照组比较,$P<0.01$

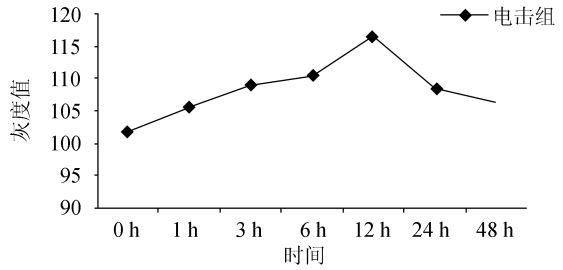


图 3 电击组兔窦房结组织 Fn 在不同时间段蛋白水平表达的灰度值变化趋势

3 讨论

电击死在法医病理学死亡原因当中较为常见,大多属意外,也可见于自杀、他杀案例中[15]。目前电击死较为公认的机制主要与电流引起的致命性心律失常以及心搏骤停相关,窦房结的功能改变可能会导致其传导系统异常从而使心律失常发生,然而这类心律失常是与心脏传导系统的起搏器窦房结发生变化有关[16],还是由于窦房结心脏电生理的改变、结构异常,现今研究和认识都相对较少。所以目前展开的相关研究都在试图寻找电击死的致死机制和更加可靠的鉴别诊断方法。大量研究指出一系列明显的病理生理性变化在受到致死性电击以后的心脏出现[7-9]。目前,电击死窦房结表达 Fn 的报道很多,所以对电击死的窦房结病理变化的深入研究,不但可以评判其在法医学领域中的实用价值,也能更好地揭示其发生的机制。

赵玉涛等[17]在人电损死后心肌中纤维连接蛋白表达的实验观察中提到 Fn 是细胞外非胶原的大分子糖蛋白,是单基因编码的二聚体糖蛋白,Fn 分子量大约 45 kD,沉降系数 12 S ~ 14 S。Fn 根据其在体内分布不同,分为血浆 Fn 和细胞 Fn。血浆 Fn 又称可溶性 Fn,在体液及血浆中以溶解状态存在;细胞 Fn 表面观呈网状或丝状,主要存在于细胞表面、基底膜、细胞外基质和结缔组织中[18]。可以加强网状内皮系统对异物的清除,具有加速胶原合成增生作用。有研究表明,细胞膜跨膜电压一旦达到 600 ~ 800 mV,多个孔状结构在细胞膜磷脂双分子层上出现,致细胞膜屏障功能丢失[19]。由于电损伤导致细胞膜破坏,通透性增加,Fn 可通过受损的细胞膜进入细胞质内。Casscells 等[20]发现,Fn 变化与大鼠心肌缺血之间的关系,大鼠心肌缺血超过 30 min,在心肌细胞内部有 Fn 出现,缺血时间越长,染色阳性范围越大,而且电镜观察已证实,Fn 染色阳性的心肌细胞已经发生不可逆性损伤。欧桂生等[21]在电击死心肌组织中 Fn 实验观察中的研究结果显示,电损伤致死与非电损伤致死的大鼠心肌相比,前者反应更加明显,此研究结果与电流对细胞的损伤有相关性。胡丙杰等[22]在纤维连接蛋白诊断心肌梗死的特异性研究指明,Fn 作为心肌梗死以后的诊断指标只受心肌炎的影响,对于诊断心肌梗死有较好特异性。有研究发现冠心病猝死者、心肌缺血也可导致心肌细胞 Fn 阳性着色[23]。

本实验人心脏窦房结 HE 染色结果显示:电击组的起搏细胞(P 细胞)边界不清 ,胞核染色加深,胞浆嗜酸性增强,伊红染色松散,一部分 P 细胞肿胀明显 ,部分胞质可见空泡及散在的细胞核固缩,而非电击死亡组(颅脑损伤死亡)无类似改变,从形态学角度可初步鉴别电击死与非电击死。此结果与刘如秀等[24]利用日本大耳白实验的模型组窦房结缺血再灌注模型也有类似表现。人免疫组化结果显示电击组 Fn 阳性表达率为 100%,而非电击组 Fn 阳性表达率为 6.67%。郝建文等[12]在大鼠电流损伤后心肌 PEG-3 表达的法医学研究中指出,电流一旦在机体内形成通路,电流就形成使带电大分子的极性发生变化、结构发生重排的电场,此电场能够使带电离子活动发生改变,最终导致窦房结细胞的一系列改变。至于电击后窦房结细胞胞浆中 Fn 表达的变化,赵玉涛等[17]曾明确指出由于电流电穿孔作用,使细胞膜通透性增高,Fn 便进入细胞内,本实验研究中电击组窦房结 Fn 免疫组化阳性颗粒即表明了细胞膜有破裂,结果表明 Fn 染色阳性的结果对不典型电损伤的法医学鉴定可以作为电损伤鉴定的辅助指标之一。

本实验兔心窦房结 HE 染色结果显示:电击后 1~6 h见窦房结组织灶性凝固性坏死,细胞核深染、扭曲,部分 P 细胞断裂;伤后 12~24 h,窦房结变性坏死的范围扩大,P 细胞呈不同程度溶解状态,有的核消失或固缩更加明显;非电击死组呈正常染色状态,无变性坏死,P 细胞不发生断裂,核状态正常。该结果表明,电击死后随着时间的延长,窦房结组织形态学改变与非电击死有明显差异。兔免疫组化结果显示电击后即刻(0 h)就有 Fn 表达,可见 Fn 表达呈灶状分布,与对照组相比差异明显;电击后 3 h、6 h 至 12 h Fn 表达分布越来越广泛,且其光密度质越来越高,与对照组比较差异有显著性。至电击死后 24 h 表达逐渐下降,至 48 h Fn表达的光密度值仍与对照组相比差异有统计学意义,而阴性对照组则未见类似改变。该结果表明电击死不同时间 Fn 的光密度值不同,随着时间的延长,呈现规律性变化。可为法医学死亡时间的鉴定提供一定的理论依据。

免疫组化技术可更好地表达电击死和重度颅脑损伤死(非电击死)心脏的 Fn 水平,电击使窦房结 Fn 表达明显增强,并且随着死亡时间的延长窦房结 Fn 蛋白阳性表达的光密度值的表达呈规律性变化。其实验结果可以做为电击死诊断及死亡时间鉴定的一个辅助指标。

[参考文献]

[1] 李万军. 电击伤(死)后心肌 PEG-3 表达的法医学研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2007.

[2] Pfeiffer H, Chesne AD, Brinkmann B. An unusual case of homicidal near drowning followed by electrocution[J]. Int J Legal Med, 2005, 10(5): 1007-1014. doi:10.1007/s00414-005-0049-7.

[3] 赵子琴. 法医病理学[M]. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社,2009:357-368.

[4] Janus TJ, Barrash J. Neurologic and neurkobehavioral effects of electric and lightning injurys[J]. Bum Care Rehabi, 1996, 17(5): 409-415.

[5] Abranov GS, Bier M. A iteration in sensory nerve function following electrical shock[J]. Bums, 1996, 22(8): 602-606.

[6] 任 盼,徐晓丽,黄 蓉,等. 大鼠坐骨神经电损伤后的实验性痛定量检测[J]. 神经解剖学杂志,2014,30(4):469-472. doi:10.11670/1000-7547.201404015.

[7] 竞花兰,姜富学,成建定,等. 大鼠电击死心脑肺及皮肤超微结构的改变[J]. 中国法医学杂志,2004,19(6):344-346. doi:10.3969/j.issn.1001-5728.2004.06.008.

[8] 张国忠,李瑞利,冯国伟,等. 电击死大鼠心脏超微结构及 HSP70、HIF-1α 表达变化[J]中国法医学杂志,2015,31(4):263-265. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2015.04.002.

[9] 孙启铭. 电击死大鼠心脏 S100A1、iNOS、Fn 蛋白变化的研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2014.

[10] 陈晓峰,梁 栋,韩 奇,等. HCN4、Cx43 在电击死者窦房结组织中的表达变化[J]. 中国法医学杂志,2015,31(4):266-268. doi:10.3969/j.issn.1004-5619.2015.04.003.

[11] 毕海涛. 早期心肌缺血死后诊断的法医学应用研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2013.

[12] 郝建文,万立华,李万军. 大鼠电流损伤后心肌 PEG-3 表达的法医学研究[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(8):947-950. doi:10.13406/j.cnki.cyxb.2008.08.036.

[13] 宋一璇,祝家镇,Laaksonen H,等. 改良的心脏传导系统检查法[J]. 中国法医学杂志,1997,12(1):31-33.

[14] 姜丽萍. Ghrelin 对 VEGF、Flt-1 在正常妊娠和妊高症胎盘中的表达调节研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2009.

[15] 赵子琴. 法医病理学[M]. 第 3 版. 北京:人民卫生出版社,2005:326-327.

[16] Haim A, Zucker N, Levitas A, et al. Cardiac manifestations following electrocution in children[J]. Cardiol Young, 2008, 18(5): 458-460. doi:10.1017/S1047951108002527.

[17] 赵玉涛,张建明,竞花兰. 人电损死后心肌中纤维连接蛋白表达的实验观察[J]. 中山大学学报论丛,2007,27(3):158-160.

[18] 李艳容,竞花兰,成建定,等. MODSE 各脏器纤维连接蛋白免疫组织化学表达的研究[J]. 中国危重病急救医学,2004,16(4):202-205. doi:10.3760/j.issn:1003-0603.2004.04.003.

[19] Plow EF, Birdwell C, Ginsberg MH. Identification and quantization of plate-associ fibronectantigen[J]. Clin Inves, 1979, 63(6): 540-543.

[20] Casscells W, Kessler KM, Basset AL, et a1. Immmunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction[J]. Am J Pathol, 1990, 137(4): 801-805.

[21] 欧桂生,竞花兰,姜富学,等. 电击死心肌组织中纤维连接蛋白的实验观察[J]. 中国法医学杂志,2002,17(5):277-278. doi:10.3969/j.issn.1001-5728.2002.05.006.

[22] 胡丙杰,陈玉川,祝家镇,等. 纤维连接蛋白在诊断心肌梗死的特异性研究[J]. 中国法医学杂志,2001,16(1):23-25. doi:10.3969/j.issn.1001-5728.2001.01.007.

[23] 贾富全,李时荣,顾 捷,等. 纤维连接蛋白及内皮素在冠心病心肌中表达研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2011,25(1):55-57.

[24] 刘如秀,谭 双,吴振宇,等. 强心复脉颗粒对兔缺血再灌注窦房结细胞凋亡及 Bax,Bcl-2,Fas-L 蛋白表达的影响[J]. 中国中药杂志,2008,33(1):76-81. doi:10.3321/j.issn:1001-5302.2008.01.019.

(编辑:魏 源)