基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1205-03

大鼠死后心肌肌红蛋白 mRNA 的含量变化与死亡时间的相关性研究

王全芳,邓世雄,蒋 朴,黄 海,李 虹
(重庆医科大学基础医学院法医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究大鼠心肌肌红蛋白(Myoglobin,Mb) mRNA 的降解规律,探讨其与死亡时间(Postmortem interval,PMI)的关系。方法:在 25℃ ± 1℃,65% ~ 70%温湿度控制系统下,通过采用 RT-PCR 技术检测大鼠死后心肌 Mb mRNA 在体保存和离体保存条件下各相应时间段的含量变化,用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析。结果:大鼠死后心肌 Mb mRNA 随死亡(离体)时间延长而逐渐降低,且与死亡(离体)时间呈线性关系,但在体保存要比离体保存降解慢。结论:Mb mRNA 的降解呈时间相关性,在体与离体条件下的降解规律并不完全一致;Mb mRNA 有望用于推断较早期死后经过时间。

【关键词】法医病理学;死亡时间;心肌肌红蛋白;逆转录 - 聚合酶链式反应
【中国图书分类法分类号】D919.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-02

The relation of the content changes of cardiac muscle Myoglobin(Mb) mRNA to degradation time in rats after death

WANG Quan-fang, et al
(*Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the degradation regularity of Moglobin (Mb) mRNAin rats and to explore the relationship between the time of death. *Methods*: Using RT-PCR to detect the Mb mRNA levels of the corresponding time changes in rat heart after death at 25℃ ± 1℃, 65% ~ 70% temperature and humidity control system, and use SPSS 17.0 software for data analysis. *Results*: The contents of the Mb mRNA in rats gradually decreased with the lengthening of the postmortem interval, and it had a proximate linear relationship with the postmortem interval. The degradation of Mb mRNA is lower than that in vitro. *Conclusion*: Mb mRNA was time-related degradation, and the degradation under the conditions of the law was not entirely consistent in vivo and vitro; Mb could be used for estimating the earlier postmortem interval.

【Key words】Forensic pathology; Postmortem interval; Myoglobin (Mb); RT-PCR

死亡时间(Postmortem interval,PMI)的推断在法医实践工作中发挥着举足轻重的作用,准确及时的推断 PMI 对确定作案时间,认定和排除嫌疑人,划定侦查范围乃至案件侦破均具有非常重要的意义[1,2]。随着科学信息技术的迅猛发展,近年来国内外学者突破了传统的检测方法和理念(如尸体现象:尸斑、尸冷、尸温、尸僵等,观察超生反应、尸体化学、胃肠内容物消化程度和蛆虫生长规律等[3-5]),纷纷将分子生物信息学技术运用到法医学研究中,并取得了显著成果。本研究通过采用 RT-PCR 技术检测死后大鼠心肌在体与离体保存条件下 Mb mRNA 的降解规律,期望找到一种更为有效的推断 PMI 的方法。

作者介绍:王全芳(1982-),女,硕士,
研究方向:法医物证学,法医病理学。
通讯作者:邓世雄,男,教授,E-mail:dengshixiong1963@163.com。

1 材料与方法

1.1 标本的分组及采集保存

取健康清洁 SD 大鼠 100 只(由重庆医科大学实验动物中心提供),重量 220 ~ 240 g,雌雄不限,按在体和离体两种处置方式随机分为在体实验组和离体实验组,每个实验组分为 0、1、2、4、6、8、12、24、48、72 h,10 个时间组,每组 5 只,断颈处死后立即置于 25℃ ± 1℃,65% ~ 70%温湿度控制系统中,按死后即刻,以及保存相应时间点提取心肌组织,立即置于液氮中,随后于 -80℃超低温冰箱保存备用。

1.2 试剂和仪器

trizole 总 RNA 提取试剂盒及 RT-PCR 试剂盒购于 Takara 公司,琼脂糖等相关试剂购于武汉博士德生物工程有限公司,PCR 仪(美国 Bio-Rad)、凝胶成像仪(美国Bio-Rad)、紫外

透射反射仪(美国 Bio-Rad)、低温高速离心机(美国 Bio-Rad)等仪器均由眼科学重庆市市级重点实验室提供,PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 RNA 抽提

准确称取心肌组织 100 mg 置入研钵中,加入适量液氮研磨至粉末状后加入 trizole 试剂 1 ml,低温高速离心机 12 000 g 离心 5 min,室温静置 5 min,与 0.2 ml 氯仿充分混合,室温静置 5 min,低温高速离心机 12 000 g 离心 15 min,取上清加 0.4 ml 异丙醇,室温静置 10 min,低温高速离心机 12 000 g 离心 10 min,倾倒上清后以 75%乙醇 1 ml 洗沉淀,低温高速离心机 12 000 g 离心 5 min,倒去乙醇后室温干燥 RNA (2～5) min,以 DEPC 水溶解,然后置于 -80℃冰箱保存。

1.4 RT-PCR 步骤

逆转录体系:严格按照逆转录试剂盒操作说明进行:10 μl 体系,逆转录反应体系:5 × PrimeScriptTM Buffer 2 μl,Prime ScriptTM RT Enzyme Mix 0.5 μl,Oligo dT Primer 0.5 μl,Random 6 mers 0.5 μl,Total RNA 2 μl,RNase Free dH_2O 4.5 μl,反应条件:37℃孵育 15 min,85℃灭活 5 s;-20℃保存备用,实验中以未加逆转录酶作为阴性对照。

PCR 反应体系:扩增产物 509 bp,上游引物:5'-CCTGGAGTTTATCTCAGAAGTCAT-3',下游引物:5'-CCCTCTAAGTAACCCTCTGTCT-3',25 μl 体系。反应条件:95℃变性 5 min,95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共进行35 个循环,72℃终末延伸 10 min。

1.5 电泳和图像分析

取上述扩增产物 5 μl 用 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,5 V/cm,30 min 左右,紫外透射反射仪下观察结果,凝胶成像系统扫描后进行图像分析。

1.6 结果判断

以 DL2000 DNA Marker 为分子量标准,有 Mb 509 bp 的目的条带为表达阳性。

1.7 统计处理

以条带灰度值作为 Mb 的相对含量,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以在体组与离体组 Mb mRNA 相对含量的均数分别与 PMI 作散点图及直线回归分析,观测其时间规律性;用 SPSS17.0 统计学软件包对数据进行统计学处理,分别对在体实验组(72 h 内)和离体实验组(24 h 内)进行方差分析(各时间点组间为不同大鼠的独立数据),其组间比较应用 Student-Newman-Keuls 法进行 q 检,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

同等条件下(温度 25℃ ± 1℃,湿度 65% ～ 70%)放置(0 ～ 72) h 的大鼠心肌标本,经提取,逆转录,扩增后出现电泳条带,肉眼观察,在体保存组 RNA 随着 PMI 的延长逐渐降低,至 72 h 已检测不出;离体保存组随 PMI 的延长条带逐渐变淡、变细,24 h 后检测不出(见图 1、2)。

在体组 Mb 和离体组 Mb 之间降解情况相比,离体组降解速度更快(详见图 3)。

对电泳条带进行灰度扫描(Scion image),计算出各组相对灰度值及半定量结果(见表 1、图 4)。

结果分析如下:以上数据为检测独立样本所得,不同时间点所测大鼠均为不同组群体(非重复测定)。在体组和离体组 Mb mRNA 各相应时间点相对含量的组间比较均有统计学意义($P<0.05$),各组间两两比较也有统计学意义($P<0.05$),但各标本间比较无统计学意义($P>0.05$),Mb 相对含量的均数与 PMI 的回归方程及决定系数(R):$y=-26.923x+366.41$,$R^2=0.978\ 2$;$y=-46.963x+343.85$,$R^2=0.9483$,R^2 均大于 0.90,直线相关性强(见图 5)。

3 讨 论

Mb 是一种分子量为 17.8 kD 的亚铁血红素氧合蛋白,由一条肽链和一个血红素辅基组成,主要存在于人及哺乳动物的心肌、骨骼肌中,心肌中含量尤为丰富,主要功能是为肌肉组织摄取和贮存氧。Mb 因分子量小,释放入血快,达阳性判断值及峰值时间短,升幅大,是急性心肌梗死发生后最早的可测的生物化学指标。国内外许多法医学者做了关于其与心

表 1 在体组与离体组心肌 Mb mRNA 不同时间段扩增产物相对灰度值($n=5$,$\bar{x} \pm s$)

死亡时间	在体 Mb(× 10^4)	离体 Mb(× 10^4)
0 h	339.59 ± 10.09	340.29 ± 3.30
1 h	301.15 ± 9.71	247.90 ± 3.35
2 h	285.14 ± 9.64	179.71 ± 3.44
4 h	260.82 ± 9.78	129.98 ± 3.40
6 h	243.67 ± 9.64	95.58 ± 3.37
8 h	218.43 ± 10.00	49.32 ± 3.40
12 h	176.94 ± 9.91	9.66 ± 3.28
24 h	136.27 ± 9.97	7.71 ± 1.00
48 h	65.30 ± 10.04	0.00 ± 0.00
72 h	11.51 ± 6.72	0.00 ± 0.00

注:在体组与离体组分别进行组间比较 $P<0.05$;各相邻组间比较 $P<0.05$

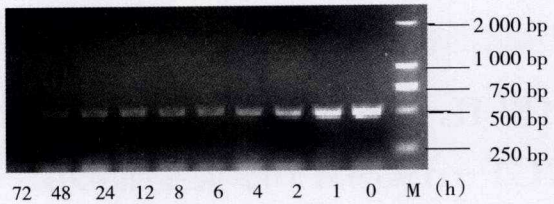


图 1 在体组心肌 Mb mRNA 死后不同时间段扩增产物电泳结果



图 2 离体组心肌 Mb mRNA 死后不同时间段扩增产物电泳结果

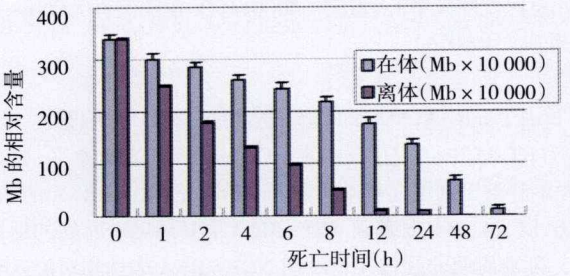


图 4 在体组和离体组 Mb mRNA 各时间段的相对含量

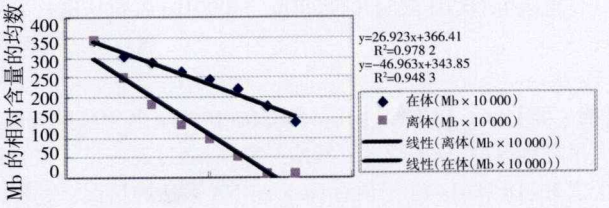


图 3 在体组与离体组(24 h 内)Mb mRNA 相对含量均数与(离体)时间关系直线回归图

源性猝死,毒物分析及损伤时间推断等方面的研究[7-13],但关于 PMI 推断的报道很少。本实验利用 RT-PCR 技术对死后大鼠在体与离体心肌组织进行研究,期望找到更为可靠的推断 PMI 的新指标。

在法医学实践中,特别是碎尸案件,尸体所处的环境往往是相当恶劣的,经过风吹雨淋,长时间太阳暴晒,原有的细菌,昆虫及人为因素等破坏后,体表组织已大部分失去了原有的检测价值,而心脏却是尸体腐败后保存相对持久的一个器官,往往其它器官已高度腐败时,心肌仍可被识别检测[14]。近年来国内外学者研究发现 RNA(尤其是 mRNA 和 rRNA)并非想象中那样脆弱,某些组织的 mRNA 有足够的稳定性可用 PMI 的推断[7]。Inou[12]等和肖俊辉[7]等做了此方面的研究,证实了其稳定性,但他们大部分都基于在体情况的研究,未涉及离体情况,鉴于法医工作者的实践需要,本实验设置在 25℃ ± 1℃,65% ~ 70%温湿度条件下(参照重庆当地温湿度情况)对在体组与离体组大鼠心肌组织进行研究,利用 RT-PCR 技术对心肌 Mb mRNA 进行逆转录扩增, 通过电泳条带进行检测,获得了同样满意的结果。

近年来随着分子生物信息技术的日益成熟和广泛应用,国内外众多学者已尝试从细胞分子水平进行研究,通过检测 DNA,RNA 等进行 PMI 推断已有不少报道[7-13]。基于以往学者的研究成果,本实验利用 RT-PCR 技术对心肌 Mb mRNA 做了进一步的研究。实验结果显示:Mb mRNA 含量变化与 PMI 之间的决定系数(R^2)均在 0.90 以上,其线性相关程度很强;对在体组与离体组各时间段 Mb mRNA 相对含量分别进行组间及两两比较并作统计学分析,均有统计学意义($P<0.05$),表明在体和离体状态下大鼠 Mb mRNA 的相对含量都随死亡(离体)时间的延长而逐渐降低,并呈时间规律性,可以作为 PMI 推断的辅助指标;各标本间无统计学意义($P>0.05$),则表明本实验中各标本 Mb mRNA 的含量变化与个体因素无关;在体组 Mb mRNA 72 h 内均可检测到,但(48 ~ 72) h 内电泳条带已极为模糊,离体组 Mb 仅在 24 h 内检测到,且(12 ~ 24) h 内电泳条带仅存条带影,表明 Mb mRNA 可作为早期 PMI 推断的指标,也适宜于离体后 12 h 内的 PMI 检测;图 3 示 Mb mRNA 在体组与离体组降解规律并不完全一致,离体组的降解要快一些。RNA 的降解速度主要与 RNA 酶(RNase)含量及温度有关,RNase 存在于各种环境中,其理化性质稳定,有较强的生物学活性,主要作用于 C 端和 U 端残基处专一地催化 RNA 的核糖部分使 3,5 - 磷酸二酯键裂开,从而发生降解。当组织细胞离开活体或生长环境后,RNase 即会开始降解 RNA。与体内环境相比,外界环境中的 RNase 丰富稳定,最常见的有毛发,灰尘,唾液等以及一些细菌真菌病毒也可产生 RNase,考虑以上因素可能会导致离体情况下 Mb mRNA 的降解加快,因影响因素颇多,其具体原因还有待于进一步研究探讨。

本实验结果发现在体与离体条件下心肌 Mb mRNA 的降解呈时间规律性,可以为早期 PMI 的推断提供新的思路,但是在法医学实践当中尸体各组织所处环境千差万别,因此,在进行 PMI 推断时应多个指标综合应用,不适宜单独应用。在以后的研究中我们将运用多种技术对不同器官多个指标多种影响因素进行定性定量检测,为法医学实践工作提供更为全面的技术和理论支持。

(致谢:衷心感谢眼科学重庆市市级重点实验室的杨培增教授、彭周贵、侯胜平等各位老师在本实验过程中给予的大力支持和帮助!)

参 考 文 献

[1] Morris J A,Harrison L M,Partridge S M.Postmortembacteriology: are-evaluation[J]. J Clin Pathol,2006,59(1):1-9.

[2] Mulla A,Massey K L,Kalra J.Vitreous humor bio-chemical constituents:evaluation of between-eye differences[J].Am J Forensic Med Pathol,2005,26(2):146-149.

[3] Alousi L M,Anderson R A,Worster D M,et al.Factors influencing the precision of estimating the postmortem interval using the triple-exponential formulae(TEF):A study of the effect of body variables and cover-

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1208-04

白介素 -13(IL-13)和白介素 -18(IL-18)调节支气管哮喘大鼠神经生长因子 mRNA(NGF mRNA)的实验研究

廖翎帆[1],陈 文[1],代继宏[2],周远大[3],何海霞[3]

(1. 重庆市妇幼保健院儿科,重庆 400013; 2. 重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心,重庆 400014; 3. 重庆医科大学第一附属院临床药理研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:初步探讨 IL-13 和 IL-18 对支气管哮喘大鼠神经生长因子 mRNA(NGF mRNA)表达的影响。方法:建立 Wistar 大鼠哮喘模型,分离脾淋巴细胞并培养,通过逆转录 - 聚合酶链反应(RT-PCR)半定量法测定 NGF mRNA 的基础水平,并观察予以 IL-18 和 IL-13 干预后 NGF mRNA 表达的情况。结果:哮喘大鼠脾淋巴细胞在基础状态下具有表达 NGF mRNA 的功能,并在 ConA 刺激下呈时间依赖性增强。空白对照组培养脾淋巴细胞 0、12、24、48 h 时基础 NGF mRNA 表达量随着时间的延长逐渐升高,IL-13 组随着时间的延长基础 NGF mRNA 表达量逐渐升高。随着时间的延长,IL-13 组 NGF mRNA 表达相对值逐渐升高,并且至 12 h 后分别显著高于各时间点的空白对照组($P<0.01$)(表 1)。同时随着 IL-13 干预浓度的依次增高,NGF mRNA 表达相对值逐渐升高,并且分别与前一梯度低浓度处理组相比较有显著差异($P<0.05$);而随着 IL-18 干预浓度的依次增高,NGF mRNA 表达相对值却逐渐降低。结论:在哮喘中 Th2 类细胞因子 IL-13 可上调淋巴细胞 NGF mRNA 表达,Th1 类细胞因子IL-18 可下调淋巴细胞 NGF mRNA 表达,两者均呈时间和浓度依赖性;Th1/ Th2 类细胞因子免疫失衡可能通过调控 NGF mRNA 表达间接促进其诱导神经源性炎症。

【关键词】哮喘;神经生长因子;白细胞介素 -13;白细胞介素 -18

【中国图书分类法分类号】R562.2+5 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-02

Interleukin-13 and interleukin-18 on the expression of nerve growth factor mRNA in bronchial asthma model of rats

LIAO Ling-fan, et al

(*Department of Pediatric Chongqing Health Center for Women and Children*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of interleukin-13 and interleukin-18 on the expression of nerve growth factor mRNA in bronchial asthma model of rats. *Methods*: Four Wistar rats were sensitized and challenged with ovalbumin to establish an asthma model, and the rat splenic lymphocytes were isolated and cultured with ConA. The expression of NGF mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and were

作者介绍:廖翎帆(1976-),女,主治医师,研究方向:小儿呼吸。

通讯作者:陈 文,女,副主任医师,E-mail:llf76312122@163.com.cn。

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(编号:CSTC2007BB0268)。

ing of the torso on the postmortem brmn, liver and rectal coding ratesin forensic caes[J].Forensic Sci Int, 2002, 125(2-3): 231-236.

[4] Elmas I, Baslo M B, Ertas M, et al.Compound muscle action potential analysis in different death models: Significance for the estimation of early postmortem interval[J].Forensic Sci Int, 2002, 127(1-2): 75-78.

[5] Barus M, Suarez-Penaranda J, Otero X L, et al.Impmved estimation of postmortem interval based on differential behavion of vitreous potassium and hypoxantine in death by hanging[J].Forensic Sci Int, 2002, 125(1): 67-74.

[6] Hsu L F, Koh T H, Lim Y L.Cardiac marker point of care testing: Evaluation of rapid of on site biochemical marker analysis for diagnosis of acute myocardial infarction[J].Ann Acad Med Singapore, 2000, 29(4): 421.

[7] 肖俊辉.死后不同时间大鼠心肌膈肌肌动蛋白 mRNA 的检测[J].中国法医学杂志,2005,20(4):196-198.

[8] Yasojima K, McGeer E G, McGeer P L.High stability of mRNA postmortem and protocols for their assessment by RT-PCR[J].Brain Res Protoc, 2001, 8(3): 212-218.

[9] Kuliwaba J S, Fazzalari N L, Findlay D M.Stability of RNA isolated from human trabecular bone at post-modem and surgery[J].Biochim Biophys Acta, 2005, 1740(1): 1-11.

[10] 刘迎春,朱有法,王立新.广泛软组织损伤肾肌红蛋白免疫组化研究[J].法医学杂志,2005,21(4):241-243.

[11] Inoue H, Kimura A, Tuji T.Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study[J].Forensic Sci Int, 2002, 130(2-3): 127-132.

[12] 李 桢,徐汝昌,姚凤升,等.实验性海洛因依赖所致肌病与肾损害[J].中国药物依赖性杂志,2004,13(4):259-264.

[13] 卞 杰,沈忆文,赵子琴.肌红蛋白降解与人体死亡时间的相关性[J].法医学杂志,2007,23(2):90-91.

[14] 徐英含.最新法医病理学[M].北京:世界图书出版公司,1996.35-37.

(责任编辑:冉明会)