基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1334-04

# Fas 蛋白表达与大鼠脑损伤时间推断的研究

吴 伟[1],万立华[1],管丽丽[2],刘明树[1],王鹏飞[1]

(1. 重庆医科大学法医教研室,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院核医学科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 Fas 蛋白在大鼠脑损伤后不同时间的表达规律。方法:建立大鼠脑损伤模型。应用免疫组织化学染色方法和图片分析软件 Image-Pro Plus6.0 对脑损伤后不同时段皮质和海马区的 Fas 蛋白表达进行检测,并做 Fas 表达高峰时的稳定性实验。结果:伤后 0.5 h Fas 开始表达,此后浓度逐渐升高,至伤后 48 h 达峰值,其后开始下降,至伤后 14 d 左右表达基本消失。结论:Fas 有望成为脑损伤后损伤时间推断的可靠指标。

【关键词】脑损伤;Fas;免疫组织化学;损伤时间推断

【中国图书分类法分类号】R89;D919.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-06

# Fas protein expression for estimation of time since brain injury in rats

*WU Wei, et al*

(*Department of Forensic Medicing, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To inquire the expression of Fas after brain injury in rats. *Methods*: The model of brain injury in rats was established. The expression of Fas in the cerebral cortex and hippocampus was detected by immunohistochemistry and the ***Results*** were assessed by Image-Pro Plus6.0. We also studied the stability of the fas expression of the peak. *Results*: The expression of Fas could be detected thirty minutes after the injury, and then it increased gradually, reached the peak twenty-four hours after the injury, then decreased gradually, and returned to undetectable level fourteen days after the injury. *Conclusion*: The Fas protein may be used as one of reliable indicators in estimation of time after brain injury.

【Key words】Brain injury; Fas; Immunohistochemistry; Estimation of time since injury

Fas 蛋白是一种跨膜糖蛋白,属于肿瘤坏死因子和神经生长因子受体超家族,与其天然配体 FasL 相结合后活化,继而参与形成死亡信号诱导复合体,后者通过激活天冬半胱氨酸蛋白酶系(Caspase)途径诱导细胞凋亡[1-3]。本实验通过建立大鼠脑挫裂伤模型,对其伤后不同时段脑组织的 Fas 蛋白表达进行检测,以期为脑损伤后损伤时间的推断提供一条全新研究途径。

## 1 对象与方法

### 1.1 实验动物与主要试剂

健康 SD 大鼠 90 只,雌雄不拘,个体质量为 250 ~ 300 g,4 ~ 6 月龄(重庆医科大学实验动物中心提供)。兔抗鼠 Fas 单克隆抗体、免疫组化试剂盒、DAB 显色剂(均购自武汉博士德生物试剂公司)。

### 1.2 动物模型的制备及分组

实验动物按随机分组原则分为 3 组:损伤组 65 只,其中做稳定性实验 15 只,假损伤对照组 20 只,正常对照组 5 只,分组方法见表 1。实验前大鼠禁食 12 h,分别称重后,用 3% 戊巴比妥钠(0.12 ml/100 g)腹腔注射麻醉,俯卧固定于打击台上;于头正中切 2 cm 长创口,剥离左侧顶骨骨膜,用牙科钻于左侧顶骨钻一 6 mm 直径大小骨窗,硬脑膜应保持完整;应用改良 Feeney 自由落体法,以直径 4 mm 的圆柱体撞击硬脑膜,即 15 g 砝码从 20 cm 高处(冲击力为 300(g·cm))沿外周导管呈自由落体坠落撞击硬脑膜,撞击深度小于 2 mm,记录撞击时间,骨蜡封闭骨窗,逐层消毒,缝合头皮。假损伤组按上述方法做好骨窗后,缝合头皮,不进行打击操作。正常对照组大鼠不做特殊处理,直接处死。

### 1.3 取材和切片

实验大鼠依据分组分别于伤后不同时间行断颈处死,处死后立即取出全脑,用 4℃生理盐水冲洗脑表面积血,以脑挫裂伤灶为中心旁 2 mm 处,冠状切除脑挫裂伤灶前后端的

作者介绍:吴 伟(1980- ),男,硕士,研究方向:法医病理损伤学。现工作单位:重庆市公安局渝中区分局物证鉴定所。

通讯作者:万立华,男,教授,E-mail:ccsw@cqmu.edu.cn。

脑组织,取材置于4%多聚甲醛溶液(4℃)中固定24 h,做标本连续切片,切片厚度为3 μm。其中Fas表达最强烈的时段作死后稳定性实验,即在Fas表达高峰时段处死模型组大鼠,尸体立即置于4℃冰箱冷藏并记录冷藏时间,分别于第0、12、24、48、72、120 h按前述方法取脑组织固定切片。

1.4 染色方法

HE染色:按常规石蜡包埋切片操作规则进行。免疫组化:按免疫组化试剂盒操作说明书进行,一抗工作滴度为1:200,以PBS代替兔抗鼠Fas单克隆抗体作阴性对照。

1.5 图像分析及统计学方法

免疫组化Fas阳性表达结果为神经细胞胞膜和胞浆内有棕黄色颗粒沉着。在400倍镜下采用北航真彩型CCD采图仪随机采集每张免疫组化染色切片的皮层和海马区各5个视野,应用专业图像分析软件Image-Pro Plus6.0检测每个视野范围内阳性表达神经元的平均光密度(Average optical,AO)值,其中平均光密度=累计光密度/阳性表达面积(AO=IOD/AOI)。运用统计学方法计算出每组Fas表达的AO的均数(算术均数),数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以SPSS10.0软件包进行统计学处理,组间比较采用方差分析及$t$检验,以$P<0.05$为差异显著性。

## 2 结 果

2.1 HE染色光镜下形态学改变

正常组和假损伤组均无明显形态学改变。损伤组1 h后出现脑组织疏松,血管间歇变宽,其内可见少量红细胞,变化多不明显;6 h后部分神经细胞胞体肿胀、胞浆呈伊红色颗粒状,弥散分布于脑实质内;有部分切片可见神经细胞胞体固缩,核小而深染,以损伤灶周围多见,血管间歇内红细胞增多;12 h后损伤灶周围有大量炎症细胞(主要为多形核白

表1 实验动物分组(单位:只)

| | 0.5 h | 6 h | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h | 168 h | 336 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 损伤组 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 假伤组 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 正常组 | 5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

表2 大鼠脑挫裂伤后不同时段Fas蛋白表达(AO值,$\bar{x}\pm s$)

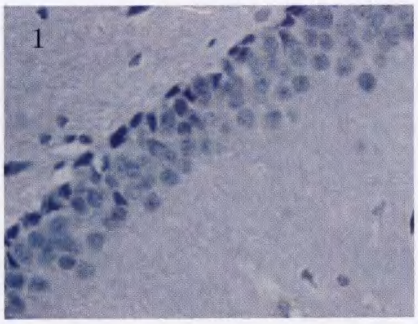
| 组别 | | 皮质区 | 海马区 |
|---|---|---|---|
| 对照组(假伤组和正常组) | | 阴性 | 阴性 |
| 损伤组 | 伤后0.5 h | 0.048±0.012 | 0.043±0.016 |
| | 伤后 6 h | 0.080±0.009 | 0.094±0.020* |
| | 伤后12 h | 0.184±0.017 | 0.219±0.019* |
| | 伤后24 h | 0.226±0.013 | 0.233±0.022 |
| | 伤后48 h | 0.244±0.017 | 0.268±0.020* |
| | 伤后72 h | 0.219±0.022 | 0.253±0.021* |
| | 伤后96 h | 0.197±0.016 | 0.228±0.018* |
| | 伤后120 h | 0.134±0.006 | 0.157±0.013* |
| | 伤后168 h | 0.021±0.015 | 0.033±0.009* |
| | 伤后336 h | 阴性 | 阴性 |

$P<0.05$,组内各时间段数据两两比较;*$P<0.05$,与同时段皮质区比较

表3 大鼠脑挫裂伤后48 h处死后稳定性比较(AO值,$\bar{x}\pm s$)

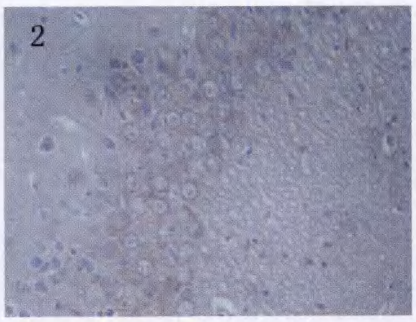
| 组别 | 皮质区 | 海马区 |
|---|---|---|
| 死后0 h | 0.244±0.017 | 0.268±0.018* |
| 死后12 h | 0.242±0.012 | 0.265±0.020* |
| 死后24 h | 0.244±0.021 | 0.270±0.019* |
| 死后48 h | 0.247±0.021 | 0.269±0.009* |
| 死后72 h | 0.246±0.022 | 0.263±0.011* |
| 死后120 h | 0.239±0.016 | 0.262±0.013* |

$P>0.05$,组内各时间段数据两两比较;*$P<0.05$,与同时段皮质区比较



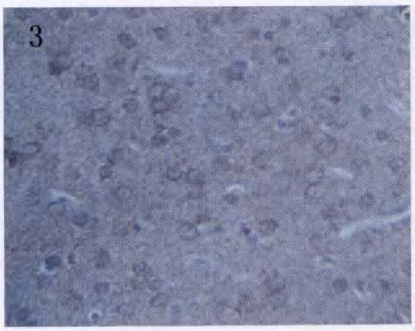
假伤组大鼠大脑海马 Fas 表达阴性，免疫组化染色 × 400

**图 1　假伤组海马区免疫组化图片**



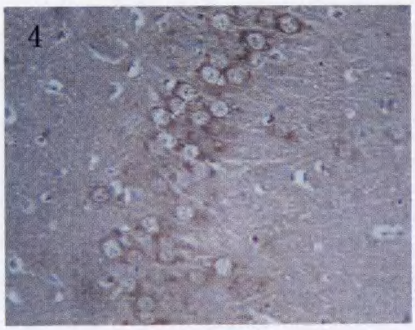
伤后 12 h 损伤侧海马齿状回神经细胞胞膜及胞浆 Fas 表达增强，免疫组化染色 × 400

**图 2　损伤组伤后 12 h 海马区免疫组化图片**



伤后 48 h 损伤侧大脑皮层神经细胞胞膜及胞浆 Fas 表达显著增强，免疫组化染色 × 400

**图 3　损伤组伤后 48 h 大脑皮层免疫组化图片**



伤后 48 h 损伤侧海马齿状回神经细胞胞膜及胞浆 Fas表达显著增强，免疫组化染色 × 400

**图 4　损伤组伤后 48 h 海马区免疫组化图片**



**图 5　损伤动物模型**



**图 6　大鼠脑挫裂伤大体标本**

细胞）浸润，细胞水肿加剧；损伤后 7 d 以上坏死区及白质有胶质细胞和纤维细胞肥大、增生，并逐渐机化，形成胶质疤痕，其中可见不少含铁血黄素巨噬细胞。

### 2.2　免疫组化染色改变

正常组和假损伤组均无阳性表达。损伤组于伤后 30 min 神经元胞膜胞浆出现微弱少量阳性表达，伤后 12 h 表达显著增强，至伤后 48 h 表达达峰值，随后逐渐下降，伤后 14 d 表达基本消失（详细定量分析结果见表 1,2），其中细胞膜表达较胞浆明显（见附图）。

## 3　讨　论

脑外伤在刑事伤害案件中属常见伤和多发伤，受害者因为伤情严重，往往陷入昏迷甚至当场死亡，在侦破工作开展时不能叙述案件经过，故对脑损伤时间的准确推断对作案时间的确定和案侦工作有很大帮助。

一些研究[4-6]证实急性脑损伤后神经细胞的损伤不仅表现为神经细胞的坏死，还表现为神经细胞凋亡；并且通过动物实验证实 Fas 介导参与了脑损伤后神经元凋亡等退行性病变的病理生理过程，以及脑内 Fas 的浓度表达与细胞凋亡程度呈明显的正

相关。本研究结果显示:正常脑组织中未见 Fas 的阳性表达,而损伤组于伤后 30 min 开始表达,浓度逐渐升高,至伤后 12 h 表达明显增加,其后维持高水平并继续增加,至伤后 48 h 表达达峰值,随后逐渐下降,伤后 14 d 表达基本消失,皮质区和海马区表达规律相同。经统计学计算,30 min 后损伤组各时间段 Fas 阳性表达与对照组(正常组和假损伤组)差异具有统计学意义($P<0.05$),表达规律与王志彦、潘洪富等[7,9]报道相似;稳定性实验显示各时间段 Fas 表达结果差异无统计学意义($P>0.05$),证明死后 5 d 内 Fas 蛋白表达稳定持久;另外值得一提的是,结果显示损伤后海马区 Fas 的表达强于相应时间段的皮质区表达,其差别具有统计学意义($P<0.05$),相关内容国内外文献尚未见报道,笔者推断可能原因有二:一是海马区是大脑内对损伤后缺血缺氧十分敏感的结构[10],故损伤因子致海马区坏死和凋亡反应较皮质区明显,从而导致 Fas 表达浓度高于同时间点的皮质区浓度;二是海马区较皮质区范围小,呈条带状,在采图时虽然是随机采集,但也只能沿着海马区移动进行采集,加上海马区 Fas 阳性表达细胞较皮质区集中,故引起图片分析过程中结果强于皮质区。笔者推断是否成立有待进一步实验论证。

从形态学的角度讲,通过 HE 染色切片推断脑损伤时间虽然可行,但是其缺点也是显而易见的:(1)需要经过较长时间才能作出判断,伤后 6 h 以上才出现较为明显的形态学改变,出现改变较晚;(2)除脑损伤外,多种颅脑疾病均可造成相似改变,特异性差;(3)各种变化的时相相互重叠,无明确的时间分界,而且难以定量分析,造成检测时主观随意性较大;(4)形态学改变主要集中在损伤灶周围,可供检测部位局限。而以上缺陷正是免疫组化检测 Fas 浓度用于脑损伤时间推断的优势所在:(1)正常脑组织中无明显阳性表达,故出现表达较易确认;(2)脑损伤后 Fas 的阳性表达较早(0.5 h),大大早于形态学的改变,并且能够定量,较形态学指标更灵敏更准确;(3)通过免疫组织化学检测方法抗原抗体特异性结合,干扰小、特异性高;(4)死后 5 d 内表达稳定,使适用检测的案例量得到保证,有利于提高分析比较的准确性;(5)对脑损伤周围组织的皮层和海马区两个部位的观测表明:脑损伤后在损伤组织周围各个部位 Fas 表达规律相似,且呈正相关,这就为今后实际运用中的取材提供了方便。故本研究认为,Fas 在大鼠脑挫裂伤后表达规律稳定,有望成为脑损伤后损伤时间推断的可靠指标,值得进一步深入研究。

以上实验结果是在理想状态下通过动物实验获得,在应用于实际工作前还应考虑环境气候、人为破坏、种群差异、个体差异等因素影响。故笔者认为,下一步还可收集颅脑损伤后人体脑组织和模拟各种复杂环境条件下进行实验。将来如能够用于实际工作中,也应综合考虑多种条件,运用多项指标加以分析,才能排除干扰,提高损伤时间推断的准确性。

## 参 考 文 献

[1] Qiu J,Whalen MJ,Lowenstein P,et al.Upregulation of the Fas receptor death-inducing signaling complex after traumatic brain injury in mice and humans[J]. J Neurosci,2002,22(9):3504-3511.

[2] Michael A,Moskowitz,Dean A Le,et al. Caspase and upstream mechanisms in central nervous system ischemic injury[J]. International Congress Series,2003,1252(1):155-161.

[3] Martin-Ventura JL,Blanco-Colio LM,Munoz-Garcia B,et al.NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability[J].Stroke,2004,35(2):458-463.

[4] Rosenbaum DM,Gupta G,D'Amore J,et al.Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia[J].J Neurosci Res,2000,61(6):686-692.

[5] Martin-Villalba A,Hahne M,Kleber S,et al.Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke[J].Cell Death Differ,2001,8(7):679-686.

[6] Rothstein JD,Bristol LA,Hosler B,et al.Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994,91(10):4155-4159.

[7] 王志彦,路文婷,赵增海.大鼠创伤后海马区 Fas 蛋白表达对神经细胞凋亡及学习记忆功能影响[J].中华临床医学研究杂志,2005,11(9):2444-2446.

[8] 潘洪富,王 晔,陈晓刚,等.Fas 在大鼠轻型闭合性颅脑损伤脑组织中的表达[J].四川大学学报(医学版),2005,36(2):243-245.

[9] 赵景霞,刘清军,崔建忠,等.大鼠脑创伤后海马区 FAS 蛋白表达与神经细胞凋亡[J].第三军医大学学报,2005,12:44-46.

[10] 朱 洁,李光勤,王 莉,等.改良的新生大鼠海马脑片缺氧缺糖模型的制备方法[J].重庆医科大学学报,2008,33(11):1281-1283.

(责任编辑:关蕴良)