基础研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0908-04

# 大鼠皮肤切创愈合过程中 E- 选择素及 ICAM-1 表达及法医学意义

汪 平,邓世雄,史文军

(重庆医科大学基础医学院法医教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨大鼠皮肤切创愈合过程中 E- 选择素(E-selectin)及细胞间粘附分子 -1(Intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)表达变化规律及法医学意义。方法:建立模型后,应用免疫组化方法,观察大鼠生前皮肤切创后不同时间点 E- 选择素及 ICAM-1 的表达变化,并用图像分析系统对图像分析。结果:正常组无 E- 选择素表达,切创后 1 h E- 选择素在损伤周围血管内皮细胞有阳性表达,伤后 1 d 达峰值,以后开始下降,持续至伤后 7 d,且 E- 选择素随时间呈规律性变化。ICAM-1 最早在伤后 1 h,最迟在伤后 3 d 在表皮层中呈阳性表达。此外,ICAM-1 还在炎症细胞、成纤维细胞及损伤周围血管内皮细胞有阳性表达,且随损伤时间呈规律性变化。E- 选择素及 ICAM-1 在死后伤中均为阴性表达。结论:E- 选择素及 ICAM-1 可作为法医学损伤时间的参考指标。

【关键词】E- 选择素;细胞间粘附分子 -1;皮肤切伤;损伤时间推断;免疫组织化学;

【中国图书分类法分类号】D919.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-01

# Expression of E-selectin and ICAM-1 in the healing process of incised wounds of rats skin and its significance in forensic medicine

*WANG Ping, et al*

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression regulation of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the heading process of incised wounds of rat skin and its significance in forensic medicine. *Methods*: After establ ishment of model, a study on the expression of E-selectin and ICAM-1 in vital rats skin incised wounds at different times were performed by immunohistochemistry technique, and evaluated with image analysis technique and statistic system. *Results*: There was no expre -ssion of E-selectin in the skin of normal control group. Positive expression of E-selectin could be observed on epidermis cells surface around injury 1h after injury. The expression level of E-selectin reached its peak on day 1 and then started to decline, lasted till day 7. The ratios of E-selectin positive vascular endothelial cells changed regularly according to different time after wound. In the vital skin incisions, while positive stain of ICAM-1 stain was observed on vascular endothelium as early as 1h after incision and lasted till 3d. In addition, the expression of ICAM-1 was also found in the inflammatory cells and fibroblasts and on vascular endothelium surface around injury, the lasting period varied from group to group There were no positive expression of E-selectin and ICAM-1 in the postmortem incision group. *Conclusion*: E-selectin and ICAM-1 are considered potentially useful markers for timing of wound age determination in forensic practice.

【Key words】E-selectin; ICAM-1; Skin incised injury; Timing of wound age; Immunohistochemistry

Dressler 等[1]采用 IHL 技术对伤后不同时间的皮肤检材中的粘附分子(Adhesion molecule,AM)进行检测,研究发现 E-选择素(E-selectin)和 ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)在皮肤中呈阳性表达。认为它们可用于皮肤损伤时间推断。然而在国内它们运用于法医学判 定皮肤损伤时间方面的研究很少。本研究应用免疫组织化学方法,观察大鼠皮肤切创后不同时间 E-选择素及 ICAM-1 的表达变化,以期确定两者的表达与损伤时间变化的规律,为皮肤损伤时间推定提供有效的参考指标。

作者介绍:汪 平(1973- ),男,硕士,
研究方向: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 实验材料

1.1.1 动物模型制作分组与对照 (1)活体损伤组：重庆医科大学实验动物中心提供健康成年清洁级 SD 大鼠 60 只，体量(220±20) g，雌雄不限，随机分为 12 组，每组 5 只。用 3%水合氯醛按 0.8 ml/100 g 的剂量腹腔注射麻醉大鼠、剪毛、消毒后，在头部切长 1.5 cm 切口，深达颅骨。造创后创面自然止血，不包扎，不施药，保持伤口干燥。将大鼠置无菌室单笼饲养，给予消毒的食物和水。分别于伤后 30 min，1、2、3、5、7、9、12 h 和 1、3、5、7 d 将大鼠断颈处死取材。(2)死后伤组：15 只健康 SD 大鼠，随机分为 3 组，断颈处死待心跳停止后，在头部切长 1.5 cm 的切口，深达颅骨，分别于伤后 30 min、1 h、3 h 取材。(3)正常皮肤对照组：5 只健康 SD 大鼠，大鼠处理同实验组，但不进行造创手术，断颈处死后取材。

取以上相应时间点伤口处或相应处皮肤组织标本(大小均为 1.5 cm × 1.0 cm)后均放入 4%多聚甲醛 -PBS 液中固定 12 h 后，石蜡包埋，行常规石蜡切片，厚度为 5 μm，常规 HE 染色。

1.1.2 主要试剂及来源 兔抗鼠 E- 选择素多克隆抗体(BA0615)、兔抗鼠 ICAM-1 多克隆抗体(BA0541)、即用型 SABC 免疫组化试剂盒(sAl022)、DAB 酶底物显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 免疫组织化学染色 ①石蜡切片常规脱蜡、脱水；②3%的过氧化氢孵育 10 min，微波抗原修复；③5%BSA 封闭液室温下孵育 20 min；④加入适当稀释的一抗(1:100)，37℃孵育 3 h；⑤滴加生物素化山羊抗兔 IgG，37℃孵育 20 min；⑥滴加 SABC 试剂，37℃孵育 20 min；⑦DAB 显色 5 ~ 10 min，水洗，苏木素复染、透明、中性树胶封片。阴性对照组用 PBS 代替一抗。

1.2.2 图像分析与统计学处理 在光学显微镜(×400)下，E- 选择素在血管内皮呈棕黄色为阳性表达；ICAM-1 在血管内皮、多核粒细胞、单核细胞和成纤维细胞呈棕黄色颗粒为阳性表达。在每张切片中随机选择 5 个视野计数微血管数量，计算每个视野中血管内皮细胞阳性数量与总的血管数量的比值为 E- 选择素阳性率(Positive ratio，PR)；计算每个视野中 ICAM-1 呈现的阳性细胞总数与上述 4 种细胞总数的比值为 ICAM-1 阳性率(PR)。检测所得的数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示。统计学处理采用 SPSS11.0 软件进行单因素方差分析。各组间两两比较采用 $t$ 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 常规 HE 染色

伤后 1 h，创口周围毛细血管扩张、充血，组织间水肿；伤后 12 h 内，可见大量炎性细胞游出，主要以中性粒细胞浸润为主；伤后 1~3 d，肉芽组织逐渐形成并大量增生，炎性细胞以单核-巨噬细胞为主；伤后 5~7 d，肉芽组织成熟，成纤维细胞生成，炎性细胞消失，创口基本愈合。死后造创组及正常对照组镜下无上述改变。

### 2.2 创口愈合过程中的免疫组织化学改变

2.2.1 E-选择素 活体损伤组中，伤后 1 h 内未见明显表达；在伤后 1 h，在创缘周围毛细血管内皮细胞可见阳性(棕黄色)表达，以后持续升高，至伤后 1 d，阳性表达达到高峰；以后表达逐渐减弱，至伤后 7 d，仍见少量阳性表达。伤后 1、3、5 d E-选择素免疫组化染色分别(见图 1、3、5)。

2.2.2 ICAM-1 伤后 1 h，在损伤边缘处表皮层(基底、角质细胞)呈黄褐色表现，以后变深，后又变淡，3 d 时又变成黄褐色。伤后 1 h 内为见损伤区内白细胞及血管内皮有阳性表达，伤后 1 h 可见有少量阳性表达，其后阳性表达逐渐升高，伤后 12 h，以多核细胞粒细胞为主及少量单核细胞可见阳性表达。伤后 1 d，可见损伤边缘炎细胞、毛细血管内皮细胞呈阳性染色(达峰值)；以后逐渐降低，伤后 3~5 d，ICAM-1 主要在形成的肉芽组织中单核细胞和部分毛细血管内皮细胞呈阳性染色，以单核细胞明显；伤后 7 d，ICAM-1 仍有少量表达，其只在部分单核细胞和成纤维细胞表达。伤后 1、3、5 d ICAM-1 免疫组化染色分别(见图 2、4、6)。

2.2.3 对照组和死后伤组 ICAM-1 在正常组皮肤的表皮层、毛囊、皮脂腺中呈淡黄色染色(弱阳性)；在死后伤组中 ICAM-1 不表达。E-选择素在正常及死后伤组皮肤中不表达。

### 2.3 E-选择素及 ICAM-1 阳性细胞计数及统计学分析

通过计算阳性率，伤后 30 min 内，未见 E 选择素表达；伤后 1 h，毛细血管内皮有阳性表达；以后持续升高，伤后 7 h，E 选择素阳性率有显著增高 23.54%±3.25%，伤后 9 ~12 h 持续升高，至伤后 1 d 达高峰 58.25%±5.28%，伤后 3 d 为 30.25%±3.28%，伤后 1 h 内，ICAM-1 几乎未见表达；伤后至 7 h，ICAM-1 阳性细胞比率明显增高 9.87%±2.65%；伤后 12 h 持续升高 28.65%±1.70%；伤后至 1 d ICAM-1 达峰值 40.8%±3.85%；伤后 3 d 阳性细胞比率有所下降 27.4%±2.3%；伤后至 5 d 其阳性细胞比率为 15.65%±0.7%；伤后至 7 d 其阳性细胞比率为 6.65%±1.37%。

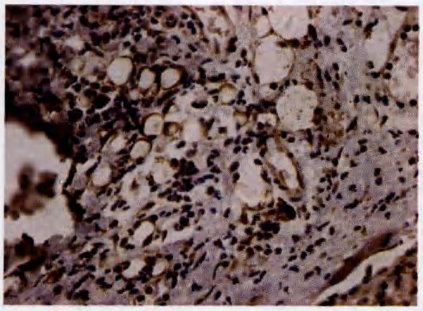


图 1　伤后 1 d E-选择素在皮肤损伤区内的表达（SABC×400）

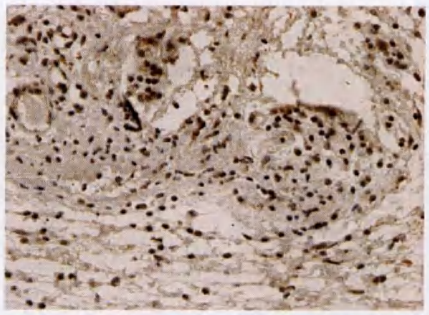


图 2　伤后 1 d ICAM-1 在皮肤损伤区内的表达（SABC×400）

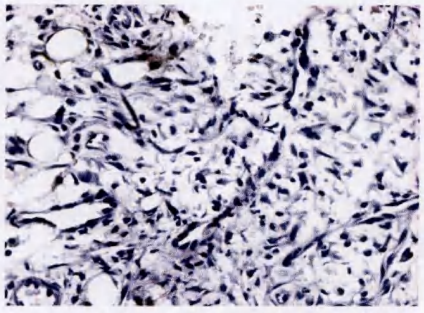


图 3　伤后 3 d E-选择素在皮肤损伤区内的表达（SABC×400）

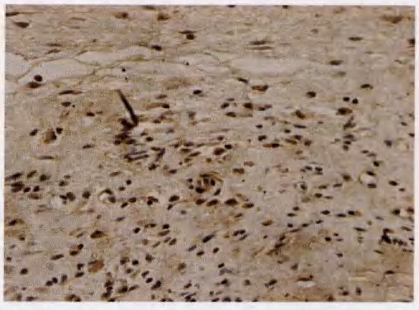


图 4　伤后 3 d ICAM-1 在皮肤损伤区内的表达（SABC×400）

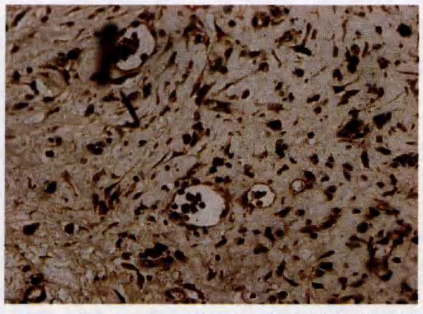


图 5　伤后 5 d E-选择素在皮肤损伤区内的表达（SABC×400）

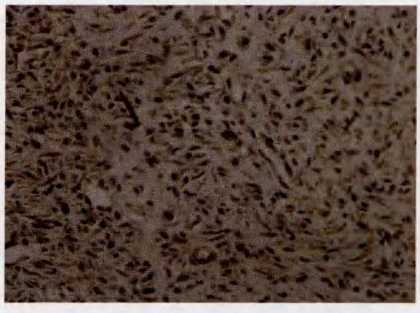


图 6　伤后 5 d ICAM-1 在皮肤损伤区内的表达（SABC×400）

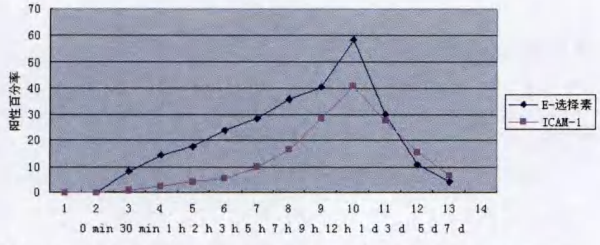



图 7　大鼠皮肤切创后不同时间 E-选择素及 ICAM-1 表达百分率

经统计学 $t$ 检验，相邻两组阳性细胞率均存在显著差异 $P<0.01$ 大鼠皮肤切创后不同时间 E-选择素及 ICAM-1 表达百分率（见图 7）。

## 3　讨　论

有研究证实，皮肤损伤后，AM 在其创伤愈合过程中发挥重要作用[2]，并在损伤早期参与损伤修复[3]。ICAM-1、E-选择素是 AM 成员之一，血管内皮细胞是上述两 AM 表达的重要细胞。E-选择素是一种细胞表面跨膜Ⅰ型单链糖蛋白，具有血管内皮细胞特异性，E-选择素基因表达快速而短暂[4]，且在胞体内无储存；ICAM-1 是淋巴细胞功能相关抗原-1（Lymphocyre function association antigen-1，LFA-1）的特异性配体，它们在受到（外伤、炎症）等刺激后活化的细胞表达，是介导白细胞与内皮细胞粘附细胞起始阶段的重要因子，通过表达促炎细胞因子、细胞表面粘附分子等而参与免疫或炎症反应[5]。ICAM-1 和 E-选择素对细胞间的相互作用具有重要意义。E-选择素及 ICAM-1 与 LFA-1 相互作用，参与中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞向血管内皮的粘附[6]，对白细胞向炎症区移行以及淋巴细胞的归

巢和再循环其重要作用。Simon 等[7]认为,滚动的中性粒细胞通过 E-选择素信号转导途径,使 $\beta_2$ 整联蛋白结合于内皮细胞上的 ICAM-1 而被激活细胞的捕获;ICAM-1 与中性粒细胞上的 $\beta_2$ 整联蛋白相互作用启动了中性粒细胞在血管内皮的牢固粘附[8]。现普遍认为:白细胞在 TNF-α、LPS、IL-1β 等刺激后的内皮细胞表面的粘附、聚集,继为渗出,是通过 E-选择素、ICAM-1 等分别在不同的阶段起主要作用,共同介导的。

本实验研究显示:伤后 1 h E-选择素在皮肤创缘毛细血管内皮细胞膜上呈阳性表达,并逐渐升高,至伤后 1 d 达到高峰,其后逐渐减弱,至伤后 7 d 仍可见少量表达。说明 E-选择素介导白细胞与内皮细胞的起始粘附中有重要作用。ICAM-1 在正常皮肤中表皮层基底细胞、角质细胞、皮肤附属器(毛囊、皮脂腺)中呈淡黄色染色。其原因可能是由于皮肤暴露于外界环境中,易受各种刺激因素的影响,需要对刺激产生某种相对较快的修复机制以实现自稳调节,由此表明 ICAM-1 在维持皮肤生物学稳态方面有重要作用[9];本实验还显示毛细血管内皮细胞、中性粒细胞、单核细胞及成纤维细胞在皮肤损伤愈合过程中均表达 ICAM-1,与给予一种特殊的 p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂后,E-选择素和 ICAM-1 表达显著减少,表明 E-选择素引起 LFA-1 的部分激活,并使依赖于 LFA-1 的 ICAM-1 的激活相符合,其作用机制可能扩大并加速炎症反应中的中性粒细胞聚集[10]。从而证实了粘附分子在炎症因子的刺激作用下活化,使白细胞粘附、穿越血管内皮细胞向炎症部位移行的观点。同时,E-选择素、ICAM-1 阳性细胞比率随伤后时间不同而表现出有规律性的变化,与炎症反应各期时相相符合;从而也表明 E-选择素、ICAM-1 在损伤愈合的炎症期起着不可替代的生物学作用[11],在皮肤损伤愈合过程中发挥重要作用;同时也表明 E-选择素表达具有特异性,而 ICAM-1 表达特异性不明显。

本研究结果显示:E-选择素和 ICAM-1 可作为皮肤损伤早期时间推断的参考指标,E-选择素在伤后 1 h 内即可出现在皮肤损伤区皮肤毛细血管内皮细胞,且在对照组、死后伤组中未见表达,其在判定死后伤与生前伤方面,无疑具有非常重要的意义;伤后 ICAM-1 在皮肤损伤区皮肤毛细血管内皮细胞、中性粒细胞、单核细胞和成纤维细胞中表达的阳性细胞率也随时间变化呈现规律性表达,并存在显著差异。综合应用此两种指标,可提高损伤时间判定的准确性和客观性。

## 参 考 文 献


[1] Dressler J, Bachmann L, Strejc P, et al. Expression of adhesion molecule in human skin wounds: diagnostic value in legal medicine[J]. Forensic Sci Int, 2000, 113(3): 173-176.

[2] 李玉林.病理学[M].第 6 版.北京:人民卫生出版社,2004.26-43.

[3] 增常茜,张逢春.医学免疫学[M].北京:人民军医出版社,2003.92-99.

[4] Edelstein L C, Pan A, Collins T. Chromatin modification and the endothelial-specific activation of the E-selectin gene[J]. J Biol Chem, 2005, 280(12): 11192-11202.

[5] Nooteboom A, Vander-Linden C J, Hendriks T. Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells after induction by lipopolysaccharite-stimulated whole blood[J]. Scand J Immunol, 2004, 59(5): 440-448.

[6] McMeekin S R, Dransfield I, Rossi A G, et al. E-selectin permits communication between PAF receptors and TRPC channel in human neutrophils[J]. Blood, 2006, 107(12): 4938-4945.

[7] Simon S I, Hu Y, Vestweber D, et al. Neturophil tethering on E-selectin activates beta-2 intergrin binding to ICAM-1 through a mitogen activated protein kinase signal transduction pathway[J]. Immunol, 2000, 164(8): 4348-4358.

[8] Merchant S H, Gurule D M, Larson R S. Amelioration of ischemia-reperfusion injury with cyclic peptide blockade of ICAM-1[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(4): HI260-HI268.

[9] Drebler J, Bachmann L, Mvller E, et al. Time dependence of the expression of ICAM-1(CD54)in human skin wounds [J]. Int J Legal Med, 1997, 110(6): 299-304.

[10] Chesnutt B C, Smith D F, Raffler N A, et al. Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin[J]. Microcirculation, 2006, 13(2): 99-109.

[11] Kondo T, Ohshima T. Immunohistochemieal detection of chemokine in human skin wounds and its application to wound age determination[J]. Im J Legal Med, 2002, 116(2): 87-91.


(责任编辑:冉明会)

## 再次改正

本刊 2009 年第 2 期第 256 页上的更正有误,现再次予以更正。第 2 行中的 2 个“namc.edu.cn”应用“nsmc.edu.cn”。表 3 数据更正:第 7 列第 8 行数据“23 ± 3.5[a]”更正为“23.0 ± 3.5[a]”;第 2 列第 9 行数据“6123 ± 55($n$=9)[a]”更正为“612 ± 55($n$=9)”;第 2 行第 3 列、第 5 列的“血糖 mmol\L”更正为“血糖 mmol/L”;第 2 行第 7 列中的“血糖(mmol\L)前”应为“血糖(mmol/L)”;表注中的“(对照组与致高血糖组”应为“(对照组与未致高血糖组”;“* 未致高血糖组与高血糖”应为“* 未致高血糖组与高血糖组”。