论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1488-04

心肌脂肪酸结合蛋白在诊断早期心肌梗死的死后稳定性研究

郭 森,万立华
(重庆医科大学基础医学院法医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨心肌脂肪酸结合蛋白(Heart fatty-acid-binding protein,H-FABP)诊断早期心肌梗死的死后诊断的稳定性。方法:建立兔急性心肌缺血模型,应用免疫组化和图像分析技术,检测死后不同时间缺血心肌细胞内H-FABP脱失面积变化规律。结果:正常心肌组织4℃放置1~2 d H-FABP染色均匀未见明显脱失,放置3 d以上,可见H-FABP脱失,且随放置时间的延长,脱失面积逐步增大。缺血心肌组织随放置时间的延长,脱失面积逐步增大,图像分析结果显示4 d以内缺血心肌组织胞浆内H-FABP的脱失面积与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),放置超过5 d以上,其脱失面积与正常对照组比较差异无统计学意义。结论:H-FABP在心肌梗死死后诊断的稳定性一般,受自溶的影响较小可用于死后4℃放置的4 d内尸体的检测,在法医学实践中具有一定的实用价值。

【关键词】早期心肌梗死;心肌脂肪酸结合蛋白;稳定性
【中国图书分类法分类号】R89 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-25

Study on the postmortem stability of heart fatty-acid-binding protein for the diagnosis of early myocardial infraction

GUO Miao, et al
(Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the stability of heart fatty-acid-binding protein(H-FABP)for the postmortem diagnosis of early myocardial infraction.*Methods*: Rabbit model of myocardial ischemia was induced by ligating the anterior branch of the left coronary artery.The areas of H-FABP depletion in the ischemic myocardial cells were studied by immunohistochemistry, image analysis technique and statistical system. *Results*: The specimens of normal myocardium kept at 4℃ for 1 to 2 days showed homogenous brown reactions for H-FABP. The depletion of H-FABP became evident when these specimens were kept at 4℃ for 3 days after death, and the depletion area increased with the lapse of postmortem interval. The depletion area of H-FABP in ischemic myocardial tissue also increased with the lapse of postmortem interval. The results of image analysis indicated that the depletion area of H-FABP in ischemic myocardial tissue within 4 d were significantly different from that in the normal control group($P<0.01$), while within 5 d the depletion area of H-FABP in the two groups was not significantly different($P>0.05$). *Conclusion*: The H-FABP shows medium postmortem stability, and small influenced by autolysis, which is suitable for detection in corpses at 4℃ 4 days after death. H-FABP as a marker for postmortem diagnosis of AMI has some practical value in forensic medicine.

【Key words】 Early myocardial infraction; Heart fatty-acid-binding protein; Stability

早期心肌梗死是心脏性猝死的主要原因之一,但准确的死后诊断一直是法医病理学的一大难题。一种理想的心肌梗死诊断指标,不仅要具有较高的敏感性和较强的特异性,还必须具有较好的死后稳定性。近年来,对H-FABP在诊断早期心肌梗死的研究引起国内外学者[1~3]的广泛重视,但对其在死后稳定性的研究尚未见报道,本实验对这个问题进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 20只健康新西兰兔(重庆医科大学实验动物中心提供),体重2 000~3 500 g,雌雄不限。

1.1.2 仪器 人工呼吸机DH-140(中国浙江);BL-410生物

作者介绍:郭 森(1972-)女,硕士,
研究方向:心脏性猝死的法医学诊断。
通讯作者:万立华,男,教授,E-mail:beiqiyou@163.com。

实验系统（泰盟科技）；BX-41显微镜图像采集系统（日本Olympus公司）；GD-8型病理影像多媒体操作系统（成都金盘电子科大多媒体技术）

1.1.3 试剂 鼠抗人心肌脂肪酸结合蛋白抗体（美国Genetex生物试剂公司）；S-P试剂盒和DAB显色剂（北京中杉生物技术有限公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 分组 兔随机分为对照组：正常对照组（A）；实验组：实验性心肌缺血3 h组（B），每组10只。

1.2.2 复制兔心肌缺血3 h的模型 3%戊巴比妥钠（30 mg/kg）耳缘静脉注射麻醉动物，仰卧固定，分离气管，切开后气管插管，连接DH-140型小动物呼吸机，维持人工呼吸。连接BL-410型生物实验系统，监测并记录动物心电活动情况。开胸，暴露心脏，切开心包，暴露左冠状动脉，行左侧冠状动脉前降支结扎术，造成心肌缺血。左心室前壁及心尖部颜色变暗，搏动减弱，心电图示ST段抬高或压低，急性心肌梗塞模型制备成功，心包不缝，逐层关胸。连续观察3 h后结束实验，处死兔子，取出心脏。

1.2.3 组织处理 取左心室缺血区在4℃冰箱放置，分别于死后1、2、3、4、5、6、7、10、14、21 d取材，10%中性福尔马林固定1～2 d后作石蜡包埋，切片厚4 μm，分别作HE染色和免疫组织化学染色，免疫组织化学染色操作依照S-P试剂盒说明书进行，PBS取代一抗作阴性对照。

1.2.4 图像分析及统计学处理 各组免疫组织化学染色切片用图像分析仪对阳性反应产物进行定量检测分析，每张切片随机选10个高倍视野，测量每个视野的总面积、阳性信号的面积，缺失面积＝总面积-阳性信号面积，所有数据应用SPSS统计学软件包对图像处理所测得数据进行统计学处理。由于方差不齐，数据先进行对数变换，多组间比较应用Student-Newman-Keuls 法进行q检验。

2 结 果

2.1 常规HE染色

2.1.1 正常心肌的死后变化 死后正常心肌4℃放置48 h以内，细胞结构清楚，心肌细胞核存在，横纹清晰，未见明显异常改变。48 h之后，心肌细胞开始呈不同程度的自溶改变，主要表现为横纹模糊或消失，有时可见细胞核消失；2周以上心肌组织结构模糊，细胞间隙增宽，排列松散。

2.1.2 缺血心肌的死后变化 兔心肌缺血3 h，镜下未见心肌梗死的形态学改变，死后4℃放置不同时间心肌细胞出现不同程度的自溶改变，7 d以内，心肌细胞水样变性，横纹模糊或消失及胞浆灶性嗜伊红性增强、胞核缩小而染色加深；放置7～21 d，同正常心脏放置后的改变类似。

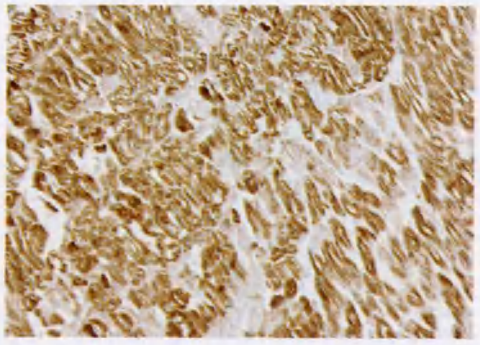
2.2 免疫组织化学镜下观察

正常心肌组织H-FABP在心肌细胞胞浆内呈强阳性表达，染色均匀，未见明显的脱失区，间质内无表达。随着标本在4℃放置时间的延长，组织间隙有H-FABP沉积，H-FABP染色阳性表达强度减弱，脱失面积逐步增加（见图1）。

心肌缺血组织随放置时间延长，心肌细胞内H-FABP脱失面积逐渐增加，缺血区心肌组织均可见不规则点、灶、片状H-FABP脱失区；部分区域心肌细胞H-FABP阳性表达强度减弱。连续HE染色对比发现H-FABP缺失及阳性表达减弱区心肌细胞胞浆嗜伊红性增强、细胞核缩小而染色加深。随着标本在4℃放置时间的延长，H-FABP阳性表达强度减弱，脱失面积增加的趋势但4 d内梗死区与非梗死区的H-FABP阳性表达有明显界线（见图2～4）。

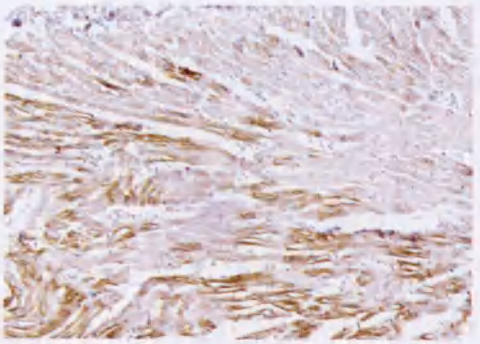
2.3 免疫组织化学染色图像分析与统计学处理（见表1）

ANOVA方差分析（F值＝924.478，$P<0.01$），说明各组面积均数间存在差异，差异有统计学意义。正常心肌组织脱失面积随放置时间延长逐渐增大，经



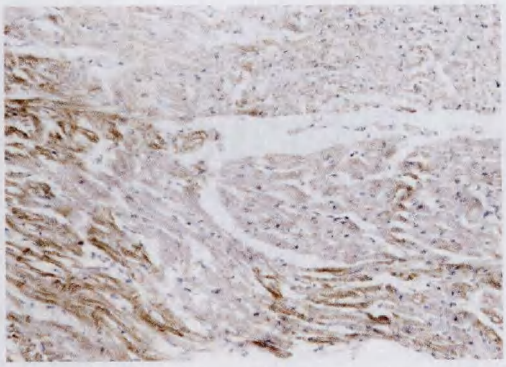
可见散在的或小灶性H-FABP缺失，染色阳性性稍减弱

图1 正常心脏4℃放置4 d（SP×200）



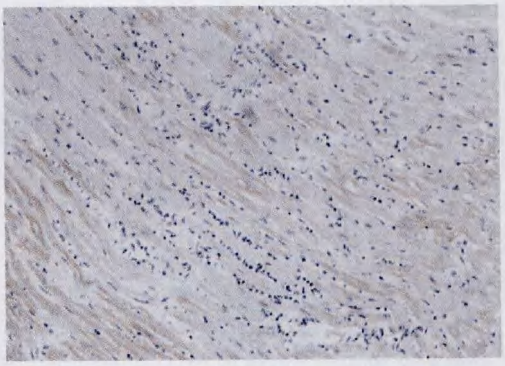
可见H-FABP片状缺失

图2 缺血心脏4℃放置2 d（SP×200）



可见H-FABP片状缺失增加，染色强度减弱

图3　缺血心脏4℃放置4 d（SP×200）



可见H-FABP片状缺失进一步增加，染色强度减弱明显

图4　缺血心脏4℃放置6 d（SP×200）

表1　死后心肌4℃放置不同时间H-FABP的脱失面

组别	放置时间(d)	缺失面积(μm²)	log	比较
B	1	8 519.25 ± 402.14	9.04 ± 0.03	C
B	2	8 579.35 ± 409.12	9.06 ± 0.02	C
B	3	8 796.44 ± 401.20	9.16 ± 0.07	C
B	4	18 816.32 ± 404.21	9.84 ± 0.07	D
B	5	28 912.43 ± 707.10	10.27 ± 0.04	D
B	7	39 123.7 ± 901.42	10.57 ± 0.03	E
B	14	48 542.7 ± 1 072.13	10.80 ± 0.06	E
B	21	51 992.4 ± 2 106.21	10.85 ± 0.07	E
A	1	297.42 ± 78.14	5.69 ± 0.02	F
A	2	301.12 ± 35.14	5.77 ± 0.03	F
A	3	879 ± 58.20	6.77 ± 0.03	F
A	4	954.33 ± 386.23	6.86 ± 0.05	G
A	5	29 473.21 ± 304.21	10.29 ± 0.04	D
A	7	38 772.41 ± 1 052.46	10.56 ± 0.06	E
A	14	46 543.70 ± 1 012.10	10.74 ± 0.05	E
A	21	49 543.70 ± 1 086.27	10.81 ± 0.06	E

注：字母相同，表示均数之间差异无显著性；字母不同，表示均数之间差异有显著性

多均数两两比较，放置3 d H-FABP脱失面积与放置1 d无显著性差异（$P>0.05$）；放置超过3 d H-FABP脱失面积与放置1 d有显著性差异（$P<0.01$）。心肌缺血组织H-FABP脱失面积随放置时间延长逐渐增大，经多均数两两比较，放置3 d H-FABP脱失面积与放置1 d无显著性差异（$P>0.05$）；放置4 d H-FABP脱失面积与放置1 d有显著性差异（$P<0.01$）；死后放置4 d以内H-FABP脱失面积与相应正常对照组有显著性差异（$P<0.01$），放置超过5 d以上，其脱失面积与正常对照组无显著性差异（$P>0.05$）。

3　讨　论

3.1　H-FABP的敏感性

早期心肌梗死死后诊断是法医学的重要研究课题之一。多年来，学者们对此进行了大量的探讨，并取得明显进展。胡丙杰等[4~6]对Fn、Mb、Dm、Fg、C5、HHF35、HSP70等一些急性心肌缺血免疫组织化学的实验研究，发现Fn在诊断急性心肌梗死死后诊断具有良好的特异性及稳定性，敏感性不及Mb、Dm，Fg、C5、HHF35。Ortmann等比较研究了心肌胞浆蛋

白中的H-FABP、Mb、CTn、Fn、Dem、C5b-9等在冠心病猝死组(阳性对照组),临床诊断冠心病猝死组(实验组)和非心脏性疾病死亡组(阴性对照组)的心肌细胞免疫组织化学染色情况发现在诊断的灵敏性H-FABP最高,其中在临床症状发作30 min内死亡者的心肌细胞即可检出明显的H-FABP脱失。明媚等[2]运用免疫组织化学的方法研究证实H-FABP在心肌缺血15 min,胞浆内即可出现明显缺失,与对照组比有明显的差异性,且随缺血时间延长,H-FABP的缺染范围逐渐扩大具有明显的时间规律,证实了H-FABP是在诊断早期心肌缺血的灵敏性指标。

作为一种新的灵敏性的心肌缺血的免疫组织化学指标,能否应用与法医检案,尚需对其死后稳定性进行研究,了解自溶、腐败对其稳定性的影响。明媚等[2]研究发现持续性心肌缺血3 h,心肌细胞内H-FABP脱失接近高峰,4 h达到高峰,心肌全层均出现明显的脱失。故本实验结扎兔冠状动脉左前降支建立心肌梗死3 h模型,首次采用免疫组织化学的方法研究H-FABP在心肌梗死死后稳定性的研究,以确定死后自溶及腐败对胞浆内H-FABP的脱失面积的影响。

3.2 自溶对H-FABP的影响

H-FABP在心肌细胞胞浆中含量丰富,约占心肌全部可溶性蛋白的5%～15%,正常人每克湿重心肌中含H-FABP约(0.52 ± 0.06) mg[8],具有较高的心肌特异性。一般而言,目前应用免疫组织化学方法诊断急性心肌缺血的4类指标中血浆成分和心肌结构蛋白受自溶的影响比较大,心肌细胞的胞浆蛋白受自溶的影响较小。原因可能是(1)死后血液循环停止,不能将大量的胞浆蛋白带到全身各处,而仍然存在于细胞内及细胞间质中,免疫组化染色仍呈阳性而不出现脱失现象。(2)自溶过程是弥漫的,缺血区与非缺血区心肌均发生自溶,因而染色较为一致。本实验发现,随着标本在4 ℃放置时间的延长,H-FABP阳性表达强度和面积有减弱的趋势。H-FABP在缺血区心肌和正常心肌细胞胞浆内表达在4 d内有显著性差异($P<0.01$),说明了H-FABP受死后自溶的影响不大;缺血区心肌组织均可见不规则点、片状,大片状H-FABP脱失区;部分区域心肌细胞H-FABP阳性表达强度减弱;实验组放置3 d H-FABPP脱失面积与放置1 d无显著性差异,放置4 d H-FABP脱失面积与放置1 d有显著性差异,放置4 d之内心肌缺血组与正常对照组有显著性差异($P<0.01$),放置5 d之后心肌胞浆内H-FABP脱失面积明显增加,阳性表达减弱,非特异性染色增强,放置5 d时梗死区与非梗死区在形态学上仍能鉴别,但无统计学意义,与正常对照组比较无差异性。4℃放置6 d以后梗死区与非梗死区H-FABP的心肌内表达在形态学上不能鉴别,可能是腐败致心肌胞浆内H-FABP降解出现类似缺血时的脱失现象。尽管如此,本实验结果应用与在法医检案之前,进行H-FABP与其它传统指标在动物模型及人体材料的对比,及福尔马林等固定液及固定时间对H-FABP抗原性的影响有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Seino Y,Tomita Y,Takano T,et al. Office cardiologists cooperative study on whole blood rapid panel testsin patients with suspicious acute myocardial infarction:comparison between heart-type fatty acid-binding protein and troponin T tests[J]. Circ J,2004,68(2):144-148.

[2] 明 媚,孟祥志.大鼠心脏型脂肪酸结合蛋白在早期心肌缺血时的含量变化[J]. 中国法医学杂志,2004,19(2):68-71.

[3] 郎博娟,孟祥志,王 琼.大鼠死亡后外周血和尿液中心脏型脂肪酸结合蛋白的研究[J]. 医学研究生学报,2005,18(7):599-608.

[4] 胡丙杰,程海鹰,陈玉川,等.早期心肌梗死后诊断若干免疫组织化学指标的敏感性比较[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2001,10(4):406-411.

[5] 胡丙杰,陈玉川,祝家镇,等.纤维连接蛋白诊断早期心肌梗死的死后稳定性研究[J]. 中国法医学杂志,2000,15(s):7-9.

[6] 胡丙杰,冯绮明,汪冠三,等.心肌梗死6项免疫组化指标的死后稳定性比较[J]. 中国法医学杂志,2003,18(4):208-211.

[7] Ortmann C,Pfeiffer H,Brinkmann B.A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage[J]. Int Legal MED,2000,113(4):215-220.

[8] Glatz J F,van der Vusse G J. Cellular fatty acid-binding proteins:their function and physiological significance[J]. Prog Lipid Res,1996,35(3):243-282.

(责任编辑:关蕴良)