维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0182-04

大鼠窒息死后脑组织中 iNOS 的表达规律研究

杨通印,邓世雄

(重庆医科大学基础医学院法医教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:对比大鼠窒息死与其它原因死亡脑组织中 iNOS 的表达规律及法医学意义。方法:制作大鼠机械性窒息死亡、失血性休克死亡、颅脑损伤死亡及断颈死亡模型;应用免疫组织化学方法及图像分析技术检测大鼠死后 iNOS 在各死亡组不同时间段、各组脑组织中的表达情况。结果:iNOS 在大鼠机械性窒息死亡,失血性休克死亡、颅脑损伤死亡的脑组织中都有表达,断颈死组无表达;机械性窒息死亡组 iNOS 表达明显高于其它各组,各组 0h 的表达都稍低于 6h、12h、24h;且各组 6h、12h、24h 的表达趋于同一水平。结论:这一发现,为在死亡后 24h 内检测脑组织中 iNOS 表达可以作为推断窒息死的 1 个生物学指标。

【关键词】机械性窒息;诱生型一氧化氮合酶;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】2007-09-28

Expression of iNOS on brain tissue in rats model of asphyxia death

YANG Tong-ying, et al

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

【Abstract】*Objective*: To compare expression of iNOS on brain tissue in rats model of asphyxia death with other death groups and forensic significance. *Methods*: The production method of mechanical asphyxia death, hemorrhagic shock death, brain traumatic death and breaks the neck to execute group model; By means of immunohi stochemistry and image analysis technology to determinate the dead rats after each group at different times of iNOS in the brain tissue of expression. *Results*: iNOS in mechanical asphyxia death, hemorrhagic shock death and brain traumatic death have expressed, breaks the neck to execute was no expression and mechanical asphyxia death group was significantly higher levels than in all levels of other group, each group of 0h expression all slightly bottom to 6h, 12h, 24h, Also each group of 6h, 12h, 24h expression tends to the identical level. *Conclusion*: This discovery, in the 24 hours after the death of brain tissue iNOS expression can be inferred from the asphyxial death of a biological indicators.

【Key words】 Mechanical asphyxia; Inducible nitric oxide synthase; Immunohistochemistry

窒息是气体交换受到严重的障碍,导致体内缺氧和二氧化碳的潴留,引起细胞代谢和生理功能紊乱的病理过程。窒息死是法医学上常见的死因之一。包括机械性窒息、缺氧性窒息、中毒性窒息等。在检案中如遇尸表检验和尸体病理解剖难以发现特征性改变的机械性窒息案例时,作出机械性窒息死亡的诊断较为困难;掌握窒息引发体内的一些变化特征,能为诊断窒息死亡提供科学的依据,为此国内外法医学者长期以来致力于寻找窒息所引发的体内特征性变化。

本实验构建了大鼠窒息死模型与失血性休克死亡、颅脑损伤死亡及断颈死亡模型,通过免疫组织化学的方法研究死后各时间段 iNOS 在脑组织中的表达变化规律。并对各组死亡方式中的表达规律进行比较,为窒息死亡的法医学鉴定提供实验依据。

作者介绍:杨通印(1976-),男,硕士,
研究方向:法医病理及法医临床学研究。

通讯作者:邓世雄,男,教授,E-mail:dengshixiong@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康、清洁的 SD 大鼠 80 只,雌雄不限,体重在 250g 左右,重庆医科大学动物实验中心提供。按照随机的原则将大鼠分为机械性窒息组、失血性休克组、颅脑损伤组和断颈死组,各组分别在死后 0h、6h、12h、24h 时段提取脑组织,各组每时段 5 只大鼠。

1.1.2 主要试剂 兔抗大鼠 NOS 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),羊抗兔酶标二抗(武汉博士德生物工

维普资讯 http://www.cqvip.com

程有限公司),ABC 免疫组化显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型的制作 (1)机械性窒息死亡组:用尼龙绳打 1 个滑动的活结,形成可滑动的活套,上端垂直悬挂在横杠上。将大鼠颈部放入尼龙绳的活套内,背对活结,依靠大鼠自身重量使活套拉紧,造成颈部压迫窒息死亡模型[1],置于 20℃环境中(在 HE 染色观察中简称为 1 组)。(2)失血性休克死亡组:分离出右侧股动脉,插入三通管,三通管连接血压计观察血压、连接注射器放血。肝素钠 500U/kg 抗凝。术毕稳定 10min 后开始放血,10min 左右血压降 40mmHg 至休克死后,置于 20℃环境中(在 HE 染色观察中简称为 2 组)。(3)颅脑损伤死亡组:用 10g 砝码从 20cm 高度,在导管内自由落体垂直打击硬脑膜,建立颅脑损伤死亡模型,置于 20℃环境中(在 HE 染色观察中简称为 3 组)。(4)断颈死亡组:用一手拇指和食指用力往下按住鼠头,另一只手抓住鼠尾,用力向后上方拉动,造成脊髓横断致死模型,置于 20℃环境中(在 HE 染色观察中简称为 4 组)。

1.2.2 组织的处理 4 种死亡组大鼠,在死后 0h、6h、12h、24h 分别取脑组织,4%甲醛溶液中固定 24h、脱水、石蜡包埋、切片。常规 HE 染色以及 iNOS 免疫组织化学染色。

1.2.3 iNOS 免疫组织化学染色法 石蜡切片常规脱蜡至气水;3%H_2O_2 室温放置 10min 以灭活内源性过氧化物酶活性;蒸馏水冲洗,PBS(pH7.2)浸泡 5min;入 EDTA 溶液微波炉热 15min 进行抗原修复;自然冷却后用 PBS(pH7.2)洗涤 5min×2 次;滴加正常山羊血清,室温孵育 20min;直接滴加 1∶100 稀释的兔抗大鼠 iNOS 多克隆抗体 4℃过夜,PBS 洗 5min×3 次;加 1∶800 稀释的羊抗兔二抗 37℃30min,PBS 洗 5min×4 次;加入 ABC 混合液体 37℃ 20~30min,PBS 洗涤 5min×3 次;苏木素复染,树胶封片。

1.2.4 结果判读及图像分析 以大鼠脑组织细胞胞浆中出现棕黄色为阳性表现,对于整体切片结果利用 Simple PCI 软件测定灰度值。试验结果用 SPSS13.0 统计分析,各死亡组和同时段的对照组及组间差异采用 t 检验和方差分析。

2 结 果

2.1 实验各组死亡过程及症状(见表 1)

2.2 常规 HE 染色镜下观察

各组脑组织细胞都历经肿胀变圆,尼氏小体溶解消失,胞浆液化,脂肪变性或空洞形成。核偏位、核仁消失或核固缩、核破碎乃至消失。神经细胞呈嗜酸性染色,可见噬神经细胞现象。各时段病理表现如下:0h,2、3、4 组脑细胞无肿胀变圆,尼氏小体溶解未出现,1 组脑细胞有轻微肿胀、尼氏小体溶解。各组脑组织结构无异常表现。6h,2、3、4 组脑细胞肿胀变圆,尼氏小体溶解可见,偶有脂肪变性或空洞形成,1 组脑细胞有明显肿胀、尼氏小体溶解、脂肪变性或空洞形成。12h 各组继上述改变后发生核偏位、核仁消失或发生核固缩、核破碎,1 组可出现细胞核消失,鬼影细胞现象。24h 各组细胞继上述改变后出现细胞自溶,胞浆呈嗜酸性染色,出现噬神经细胞现象。1 组脑组织细胞和血管周围间隙扩大,小血管和毛细管扩张充血,可见毛细管内皮细胞肿胀,脂肪变性而使血管狭窄。

2.3 免疫组化染色镜下观察

各组 0h 的染色和同组各时段相比阳性染色稍

表 1 实验各组死亡过程及症状

实验分组	死亡过程(s)	死亡症状
机械性窒息死亡组	140~313	唇舌紫绀、舌尖外露,双眼结膜充血、眼底出血,四肢抽搐,尾上翘,大小便失禁,尸僵出现早,约 15~25min 出现。
失血性休克死亡组	156~351	唇舌、双眼结膜苍白、四肢松软,尸僵出现晚,约 25~30min 出现
颅脑损伤死亡组	70~170	口鼻出血、四肢震颤、大小便失禁,尸僵约 20~35min 出现
断颈死亡组	29~63	四肢松软,尸僵出现晚约 30~50min 出现

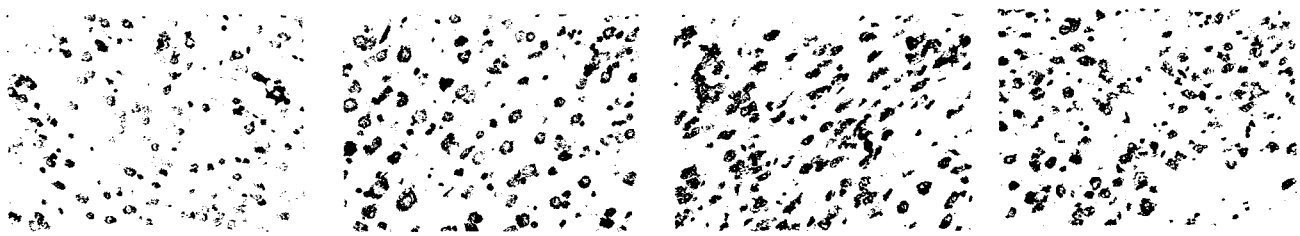


图 1 机械性窒息死亡组各时段免疫组化结果(SABC×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

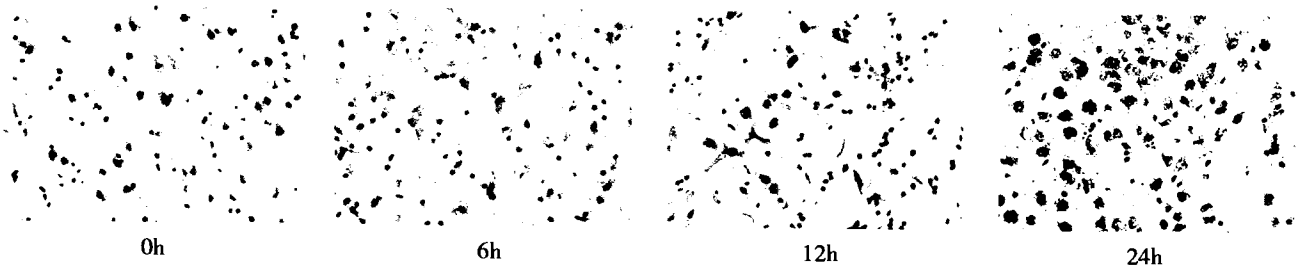


图 2 失血性休克死亡组各时段免疫组化结果(SABC×400)

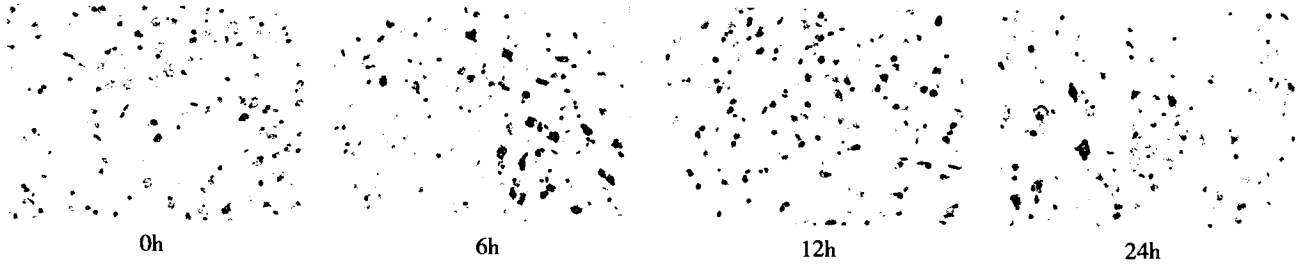


图 3 颅脑损伤死亡组各时段免疫组化结果(SABC×400)



图 4 断颈死亡组各时段免疫组化结果(SABC×400)

低,同一组染色结果在(6h、12h、24h)各时间点上没有显著染色差别,机械性窒息死亡组在大脑灰质神经元胞浆内染色深,呈明显棕黄色,基本上累及整个视野所有神经元的胞浆(见图 1)与失血性休克死亡组和颅脑损伤死亡组及断颈死亡组有显著染色差别;失血性休克死亡组和颅脑损伤死亡组神经元胞浆内染色较深,在整个视野中大部分的神经元胞浆受累及(见图 2、3),2 组间无明显染色差别;断颈死亡组未见明显染色,偶见个别神经元胞浆内有浅淡染色(见图 4)。

2.4 图像分析结果

用 SimplePCI 软件(Compix 公司,美国)测定阳性信号比率,窒息死亡组的阳性表达均较同时段其它死亡组明显增高。窒息死亡组分别与其它死亡组比率值作 t 检验,结果 $P<0.05$。有统计学差异,见表 2(比率单位:%,时间单位:h)。

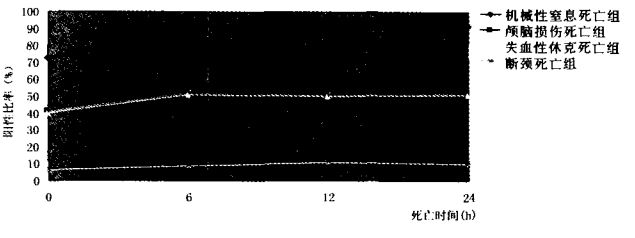


表 2 各组大鼠死后 iNOS 在各时间点阳性表达比率

3 讨 论

一氧化氮合酶(NOS),有 3 种亚型。是由不同染色体上的不同基因编码的,分为结构型 NOS(Constitutive NOS,cNOS)和诱导型 NOS[2](Inducible NOS,iNOS);结构型 NOS 又可分为神经型 NOS(Neuronal NOS,nNOS)和内皮型 NOS(Endothelial NOS,eNOS),cNOS 均为由 2 个相同亚基组成的二聚体。iNOS 在

维普资讯 http://www.cqvip.com

基态下不表达,但在缺氧、损伤、脂多糖、应激反应、炎症介质、内毒素、紫外线等因素刺激下,iNOSmRNA 编码基因被激活,可在长达数小时内表达 iNOS[3]。一旦产生就会源源不断的催化 NO 的生成,直至底物耗竭,过量的 NO 是造成缺血缺氧后神经元迟发性损伤的直接因素。iNOS 在脑缺血缺氧损伤中表达的机制可能与如下相关:iNOS 在转录水平主要由激活后的核因 -κB(NF-κB)启动表达,静息状态下 NF-κB 在胞浆内与抑制蛋白(IKB)相结合处于失活状态,但在缺氧或损伤刺激下,IKB 与 NF-κB 脱离,去磷酸化后转移进入细胞核,并与钙离子相结合启动 iNOS 基因的表达。缺血缺氧时,脑组织中 ATP 逐渐耗竭、神经元能量代谢障碍和 cAMP 依赖性蛋白激酶活性下降,使 NOS 脱磷酸化,NOS 活性增强;以及促炎性因子(IL-1、TNF、INF-r 等)增多,直接激活 iNOS;此外,缺氧后产生大量自由基,自由基可直接激活 iNOS。Huk 等[4] 在测定缺血后脑组织 NOS 活性时发现脑缺血后 NO 立即迅速短暂升高,5~15min 达高峰,30min 下降至原有水平,NO 的过量产生可以竞争性抑制超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性,并产生大量过氧亚硝基离子(ONOO)直接或降解成 OH^- 和 NO_2^-,加重细胞毒性,使线粒体呼吸功能受损,同时 NO 也易与铁结合使含铁酶失活,抑制线粒体多种酶活性,使 Na^+-K^+-ATP 酶活性失调。线粒体膜去极化、自由基生成增多,促进 Ca^{2+} 内流,导致 Ca^{2+} 超载,引发 iNOS 持续表达的恶性循环。

利用这一特征,实验通过制作机械性窒息死亡模型与其它死亡模型,并对各死亡模型的死后大鼠脑组织中 iNOS 的表达规律及特点进行比较。结果表明从死亡初期到组织腐败这段时间内,在对各死亡模型脑组织中检测 iNOS 的表达发现,机械性窒息死亡组、失血性休克死亡组及颅脑损伤死亡组的大鼠大脑皮质神经元胞浆中都有 iNOS 表达,机械性窒息组 iNOS 的表达显著高于其它各组。失血性休克死亡组与颅脑损伤死亡组的 iNOS 表达无显著差异;但明显高于断颈处死组,而断颈处死组的大脑皮质基本上无表达。各组 0h 表达与同组死后 6h、12h、24h 的表达有一定的差异性,同组 6h、12h、24h 的表达基本上处于一个平台期,无差异性。各组都有从较低水平上升到平台期的现象,可能主要是由于超生反应的存在,超生反应(Supravital reaction)[5]就是死后某些组织、细胞在一段时间仍保留某些生物活性,对一些刺激能产生反应的现象。正如 Medea 等[6]指出,死后一定时间机体组织细胞内各种物质含量基本稳定,成为超生反应存在的基础,直至生命代谢在死后继续进行到代谢底物耗竭为止。因此,在死后短时间内 iNOS 仍能持续表达,出现一个上升的趋势。超生反应的时间,因细胞的种类而不同,神经、肝、肾等细胞在机体死后很短时间内即死亡,死后 6h,脑的超生反应也结束[7],对各种刺激无反应,iNOS 的表达量就可能处于一个平稳状态,表现为平台期现象。至于机械性窒息死亡组 iNOS 的表达显著高于其它模型组,其可能原因是脑组织严重的缺血缺氧损伤,其损伤机制为:(1)在机械性窒息中,机体发生强迫呼吸,使交感神经和副交感神经过度兴奋[8],脑血管急剧收缩,使脑缺血缺氧。(2)机械性窒息,使机体强烈痉挛和抽搐,加大氧的快速耗尽,加剧脑组织缺血缺氧损坏。(3)机械性窒息,可致颅内压显著升高,中枢神经异常兴奋[9],加剧脑损伤。(4)机械性窒息,引发机体强烈的应激反应,体内 5- 羟色胺、去甲肾上腺素等水平升高,也诱导能量的耗竭和缺氧加剧。此外,呼吸道的闭塞致呼吸障碍,颈部血管受压致脑部血供停止,颈部受压迷走神经兴奋致反射性心跳骤停以及脊椎和脊髓的损伤等[5]。以上这些机制在机械性窒息死亡中都将直接或间接参与大脑的缺血缺氧损伤,而失血性休克死亡及颅脑损伤死亡引起大脑缺血缺氧损伤相对而言要单纯得多。同时也可从尸僵形成的速度来推断缺氧的严重程度,尸僵的形成原因是死后体内缺氧,ATP 生成不足至很快耗尽,肌肉代谢停止,未有足够能量让交链在一起的肌动蛋白和肌凝蛋白解链分离, 因而形成僵直复合体(Rigor complex)。而缺氧越严重,ATP 生成就越少,耗尽就越快,因而尸僵就出现得越早[10]。从表 1 中可知,在机械性窒息死亡组尸僵出现最早,而在断颈处死亡组出现最晚,另 2 组居中。说明机械性窒息死亡组脑组织缺氧最为严重,致使 iNOS 的高表达;而断颈死亡组的脑组织缺氧相对就缓和得多,iNOS 的表达则不明显。此外缺氧的持续时间也影响 iNOS 的表达,从表 1 中也得知,机械性窒息死亡组死亡最慢,则脑神经元所经历的缺氧时间长;而断颈死亡组死亡最快,则脑神经元所经历的缺氧时间短。这与缺血缺氧的严重程度致 iNOS 表达量的水平相吻合。因此 iNOS 在机械性窒息死亡组中出现明显高于其

(下转第 222 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

龋均有上升趋势，充填率低于 2002 年水平。这说明龋病在我市儿童中广泛流行，就医愿望相对较低，这与大部分家长对乳牙龋病危害的严重性[4]认识不足，儿童口腔保健意识差有关，同时，口腔卫生资源的缺乏也是影响乳牙充填的原因之一。

本次调查结果显示：重庆市 5 岁儿童龋均和患龋率均为农村高于城市，而农村龋齿充填率明显低于城市，这说明随着社会经济形势和科学知识普及程度的发展变化，龋病的流行人群分布情况也在发生着变化。以前在发展中国家，一般城市居民的患龋率高于农村，这主要是因为城市居民的饮食习惯和生活方式与农村不同，糖摄入量较多，吃甜食的频率较农村居民为高，则患龋的可能性较大[5]。近些年来，农村生活水平逐年提高，但人们护牙的意识却没跟上，其患龋率和龋均高于城市，加之农村医疗条件和技术水平还比较落后，从充填率明显低于城市可反应这一点，这也提示我们以后牙防工作的重点应由城市转向农村。因此，必须对有限的口腔卫生资源合理利用，重视对农村口腔卫生工作的培训，同时，加大口腔卫生健康教育力度，普及口腔健康的科普知识，改变错误的观念和习惯，预防乳牙龋病，对已发生的龋病早发现早治疗。在今后进行口腔健康教育和开展口腔保健措施时，应当通过各种途径进一步加强龋病危害的宣传，督促人们尽早就医，定期检查。

参 考 文 献

[1] World Health Organization.Oral health surveys:basic methods[M]. 4th ed. Geneva:WHO,1997.1-20.

[2] 全国牙病防治指导组. 第二次全国口腔健康流行病学抽样调查[M]. 北京:人民卫生出版社,1997.652-670.

[3] 林居红，李 刚，田考聪，等.重庆市青少年儿童龋病抽样调查报告[J].重庆医科大学学报,2003;28(6):775-777.

[4] Brice DM,Blum JR,S tenberg BJ.The etiology,treatment,and prevention caries[J].Compend Contin Educ Dent,1996;17(1):92.

[5] 卞金有，主编.预防口腔医学[M]. 第 4 版.北京：人民卫生出版社,2003.216-218.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 185 页)

它各组的表达。

总之，机械性窒息引发全身各系统脏器损伤，以脑组织最为严重。借助 iNOS 在机械性窒息死亡的脑组织中特异性的高表达，为我们推断窒息死亡的法医学鉴定提供实验依据。但现实案件中常遇到一些死因复杂，机体受多种复合伤致死情况。因此，对于 iNOS 在更多死亡模型的脑组织中的表达情况，还待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Zhang BL,Yang ZH,Ran P,et al. Induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha in two kinds of rats asphyxiation death models[J]. Fa Yi Xue Za Zhi,2007;23(1):4-7.

[2] Albrecht EW,Stegeman CA,Heeringa P,et al.Protective role of endothelial nitric oxide synthase[J]. J Pathol,2003;199(1):8-17.

[3] Becola C,Zhan g F,Casey R,et al.Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia[J]. Stroke,1996;27(8):1373-1380.

[4] Huk I,Brovkovych V,Vili J,et al. Bioflavonoid quercetin scavenges superexide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injuly:an experimental study [J]. Br J Sur, 2005;85(8):1080-1085.

[5] 王保捷.法医学[M]. 第 1 版.北京：人民出版社,2004.27,62.

[6] Medea B,Henssge C.Estimation of the time since death in the early postmortem period[J]. Forensic Sci Int,2004;144(2-3):167-175.

[7] 陈康颐.现代法医学[M]. 第 1 版.上海:复旦大学出版社,2004.396.

[8] Zhu BL,Ishidak,Fujita MQ,et al. Immunohistochemical investigation of a pulmonary surfactantin fatal mechanical asphyxia[J]. Int J Legal Med,2000;113(5):268-271.

[9] Quan L,Zhu BL,Ishidak,et al. Intranuclear ubiquitin immunoreactivity of the pigmented neurons of the substantia nigra in fatal acute mechanical asphyxiation and drowning[J]. Int J Legal Med,2001;115(1):6-11.

[10] Schauf CL,Moffett DF,Moffett SB.Human physiology foundation and frontiers[M]. ST LouisBoston Toronto:Times mirror/Mosby College Publishing,1990.285.

(责任编辑:关蕴良)