维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0947-04

大鼠电流损伤后心肌 PEG-3 表达的法医学研究

郝建文[1],万立华[1],李万军[2]

(1. 重庆医科大学基础医学院法医学教研室,重庆 400016;2. 汉中市 3201 医院病理科,汉中 723000)

【摘 要】目的:探讨电击伤和电击死后心肌中 PEG-3 表达的时间相关性以及其能否用于生前电击和死后电击的鉴别。方法:建立大鼠电流损伤的模型。电击伤组于电击后 0h、3h、6h、12h、24h、3d、6d、12d 断颈处死取材;电击死组分别于死后 0h、1h、3h、6h、12h 取材;死后电击组分别于断颈处死后的 0h、0.5h、1h、3h 电击后取材;阴性对照组直接断颈处死后分别于 0h、0.5h、1h、3h、6h、12h 取材,取材的部位均为左心室前壁中央部,取材后采用免疫组化染色法检测所有大鼠心肌 PEG-3 的表达情况,其结果经图象分析处理后进行统计分析。结果:电击伤(死)组在电损伤早期 PEG-3 即表达增加,且不同时间的表达有一定的规律,故可用于推断心肌电击伤(死)的时间。而在死后电击及阴性对照组只有弱表达,根据这点可以将死后电击和电击致死进行区分。结论:心肌电损伤后 PEG-3 的表达有一定的时间相关性,可以用于对电击伤(死)的诊断;心肌电损伤后 PEG-3 的表达情况可以鉴别生前电击和死后电击。

【关键词】心肌;电流损伤;PEG-3;图像分析

【中国图书分类法分类号】R89 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-13

The study for expression of PEG-3 in rats' cardiac muscle after electrical injury by the method of immunohistochemistry

HAO Jian-wen, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the expression of PEG-3 in cardiac muscle after electrical injury in order to find the time dependablity and the discrimination for the antemortem electrified and postmotorm electrified. *Metheds*: The animals were devided into two groups: the negative group and the experimental group. The experimental group were devided into three groups again: the electrical injury group, the electrouction group and the group of electrical shock after death. The electrical injury group is for 0h、3h、6h、12h、24h、3d、6d、12d, the electrouction group is for 0h、1h、3h、6h、12h, and the group of electrical shock after death is for 0h、0.5h、1h、3h, the control group is for 0h、0.5h、1h、3h、6h、12h. After all these we should get the cardiac tissue at the propotional time, and then dye it hy the method of HE and immunohistochemistry. Then we can gain the conclusion through the method of semiquantitative analysis. *Results*: The expression of PEG-3 increased in heart injury early, it may be a useful molecular index to diagnose heart injury induced by electric force. In additional, the rule of PEG-3 expression was changed following time, which may help to estimate the injury interval in forensic EI field. We can also discriminate the the electrouction group and the postmotorm electrified group, because there are only extremely tenuous positive staining for the group of electrical shock after death. *Conclusion*: PEG-3 can diagnose the electrical injury and discriminate the electrical injury, weather it formed at antemortem or postmortem.

【Key words】 Cardiac muscle; Electrical injury; PEG-3; Image analysis

电流损伤的诊断以及电击致死和死后电击的鉴别仍是法医实践中较难解决的问题之一。研究表明,PEG-3 是与核损伤有关的基因,其与 gadd34/MyD116 基因具有高度的同一性,被认为是 gadd34/MyD116 家族的新成员[1],在正常情况下其在细胞内的表达极其微弱。马智华等[2]通过基因芯片研究发现 PEG-3 是心肌电损伤中表达特异性较强的一个基因。本实验用免疫组化方法对电流损伤后心肌细胞中 PEG-3 蛋白的变化情况进行检测,以期为电流损伤的诊断及电击死和死后电击的鉴别提供新的依据,同时更大范围地扩大该指标的实际法医学应

作者介绍:郝建文(1979-),男,硕士,研究方向:法医病理学,法医人类学。

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

维普资讯 http://www.cqvip.com

用价值。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

PEG-3 免疫组织化学用试剂盒(博士德)与 DAB 显色剂(北京中杉生物技术公司)。

1.2 实验动物

健康的 Wister 大鼠,雌雄不限,250g 左右,由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.3 动物模型

将大鼠随机分成两大组:阴性对照组和实验组。阴性对照组又按照断颈处死后取材时间的不同分为 6 个亚组(0h、0.5h、1h、3h、6h、12h),其主要为死后的情况做对照。实验组又分为 3 个小组(每个小组按取材时间不同又分为几个亚组),即:电击伤组(0h、3h、6h、12h、24h、3d、6d、12d)、电击死组(0、1、3、6、12h)和死后电击组(0h、0.5h、1h、3h),共计 23 组(n=3)。

建模的方法分别是:(1)阴性对照组采用断颈处死;(2)电击是在 220V 交流电源的两端各接一金属夹,把金属夹分别直接夹住大鼠左后肢和右前肢近踝关节仅有少量细毛的地方。电击伤组电击 30s;电击死组直接电死;死后电击组是在断颈处死后分别于相应的时间进行电击,电击时间 90s。模型建立后分别在相应的时间取心脏组织置于 4%的中性甲醛溶液固定 24h 后用石蜡包埋、切片,进行 HE 和免疫组织化学染色,然后进行半定量分析。

1.4 染色方法

HE 染色:采用常规方法染色。

免疫组织化学染色:按照试剂盒说明书进行,一抗的工作浓度为 1∶200,以 PBS 代替一抗做空白对照。

1.5 结果判定及图象分析

免疫组化阳性反应为细胞内有棕黄褐色颗粒沉积。在低倍光镜下找到阳性反应区域,再在 400 倍光镜下观察阳性反应情况,每个部位的阳性反应区域随机选取 8 个视野用 Biomias 图像分析仪对其染色强度进行分析,结果用灰度值表示。灰度值为 0~255,代表阳性反应强度,灰度值越高,阳性反应越强。

1.6 统计分析

图象分析检测数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学处理用 JMTJFX 软件进行 t 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 病理改变

电击伤组 3~6h:心肌多灶性坏死,广泛心肌断裂、缺血,部分心肌细胞呈波纹状排列及收缩带坏死;心肌胞浆凝聚、均质变和嗜酸变,部分心肌横纹不清,胞核固缩、深染、扭曲,部分核伸长,部分核染色质边集、核膜增厚、呈空泡状;心肌间隙增宽,水肿,部分区域散在出血;细小血管扩张,红细胞聚集,血管内皮细胞细胞核固缩、深染,平滑肌变性。12h~3d:心肌变性坏死的范围扩大,心肌细胞浑浊肿胀更加明显,心肌细胞内小肌束间隙增宽使心肌横断面呈筛状;部分心肌细胞呈肌溶解、肌浆淡染,部分心肌细胞核消失;心肌间细小血管扩张,内皮细胞肿胀、坏死、脱落,平滑肌层疏松肿胀,大量红细胞粘附于血管壁,管腔内嗜中性粒细胞聚集,仅个别炎症细胞游出血管外。6~12d:心肌变性坏死范围仍在扩大,大片心肌溶解坏死,肌间隙明显增宽,心肌间较多成纤维细胞及纤维组织增生。电击死组和死后即刻电击组也有类似改变,阴性组未见类似改变。

2.2 免疫组化染色

电击伤组心肌细胞内有很强的阳性染色,位于肌浆内,呈棕黄褐色,在电击后即刻就可见表达增加,12h 达到高峰,随后逐渐下降,第 12d 其值仍高

表 1 大鼠电击伤不同时段心肌 PEG-3 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	免疫组化灰度值
对照组	91.85±6.41
0h	100.47±7.08①②
3h	105.88±8.33①②
6h	119.48±9.46①②
12h	131.90±10.34①②
24h	122.95±9.17①②
3d	113.42±8.64①②
6d	104.32±8.33①②
12d	97.97±7.73①②

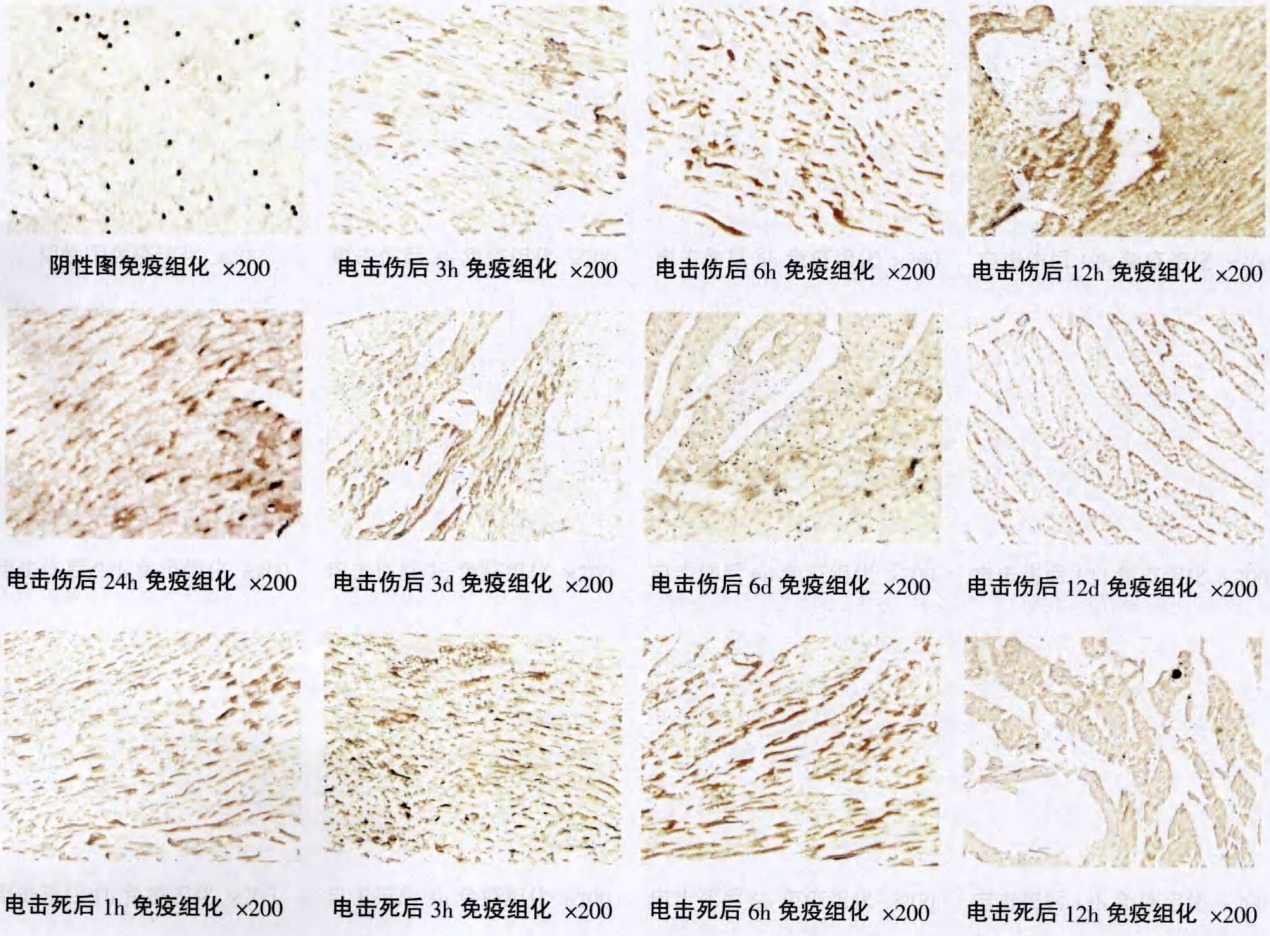
注:表中①为与阴性对照比较 $P<0.05$;②为与上一组比较 $P<0.05$

表 2 大鼠电击死不同时段心肌 PEG-3 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

时间点	免疫组化	
	对照组	电击死组
0h	92.13±6.41	103.81±7.12①
1h	96.30±11.71	109.66±8.82①②
3h	95.25±10.53	121.05±10.06①②
6h	95.65±11.26	111.40±8.68①②
12h	96.17±10.33	101.54±7.46①②

注:表中①为与即刻阴性组和相应时间的阴性组比较 $P<0.05$;②为与上一组比较 $P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com



阴性图免疫组化 ×200　电击伤后 3h 免疫组化 ×200　电击伤后 6h 免疫组化 ×200　电击伤后 12h 免疫组化 ×200

电击伤后 24h 免疫组化 ×200　电击伤后 3d 免疫组化 ×200　电击伤后 6d 免疫组化 ×200　电击伤后 12d 免疫组化 ×200

电击死后 1h 免疫组化 ×200　电击死后 3h 免疫组化 ×200　电击死后 6h 免疫组化 ×200　电击死后 12h 免疫组化 ×200

死后电击即刻免疫组化 ×200

图 1　大鼠电流损伤后不同时段心肌 PEG-3 表达的免疫组化图

表 3　大鼠死后电击不同时段心肌 PEG-3 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

时间点	免疫组化	
	对照组	死后电击组
0h	92.13 ± 6.41	104.68 ± 8.47①
0.5h	95.68 ± 10.91	95.74 ± 12.09
1h	96.30 ± 11.71	94.87 ± 10.95
3h	95.25 ± 10.53	96.04 ± 9.77

注:表中①为与阴性对照比较 $P < 0.05$

于对照组(见表 1);电击致死组在死后即刻也可见阳性表达,在 3h 时达到高峰,随后逐渐下降,12h 时仍高于对照组(见表 2);而死后电击组仅在死后即刻可见此改变(见表 3),阴性对照组则未见类似改变。

3　讨　论

电击伤和电击死是法医实践工作中常遇的案例,但其致伤(死)机制尚不清楚,且诊断有一定的困难,故目前展开的研究都在企图寻找最可靠的诊断方法。皮肤电流斑、金属化是法医工作者诊断电击伤和电击死的主要依据,但并不是所有的案例都会出现这些典型的电击标志,研究发现只有约 1/3 的案例会出现[3],因此其适用范围非常有限。大量研究表明心脏在受到电击,特别是致死性电击后会出现一系列明显的病理生理改变。但能否利用电击后心脏的病理生理改变诊断电击伤和电击死,目前还没有统一的意见。故深入研究心脏电击伤和电击死的病理变化,不仅有助于于揭示其发生机制,更有助于评判其在法医学领域中的应用价值。

维普资讯 http://www.cqvip.com

电击伤和电击死的导致原因是特殊的，其机制尚不清楚，目前只有 3 种假说：(1)电热作用；(2)电场学说(电击穿学说)；(3)继发损伤学说[4-8]。

本实验在 HE 染色中观察到的心肌广泛断裂，部分细胞核伸长、空泡变性、坏死以及结构的改变可能与核酸、脂蛋白在电场作用下发生重排而引起的细胞结构改变有关[7,8]。而就原位杂交和免疫组织化学染色所发现的 PEG-3 的表达变化，由于在电击伤、电击死和死后电击的即刻都出现了较强的阳性表达，但是所有这些阳性表达都位于心肌细胞的胞浆内，而没有穿过细胞膜流入间质，这说明电场学说中认为的电场使细胞膜穿孔或破裂的说法是不可靠的。就本实验的研究结果来看，应该是当电流在机体形成通路时，电流形成电场，但这个电场的作用只是使带电大分子的极性发生了改变，结构发生了重排，从而使带电的离子如钠离子、钾离子的活动发生了改变，最后导致了心肌细胞的一系列改变。但这个电场作用的推断是否可靠，最好应用强磁场对其进行进一步的考证。至于电击后心肌细胞胞浆中 PEG-3 表达的变化，应该是电流作用在短时间内使正常心肌细胞内的生理变化发生了微妙的改变，从而导致了短时间内 PEG-3 表达的增加，而后随着时间延伸，PEG-3 的进一步变化则正是在这一微妙变化基础上的发展。

对电击伤和电击死后的心肌变化有不少学者进行了研究。如秦志强等[9]通过电镜观察发现电击伤心肌细胞可见线粒体肿胀，肌质网扩张，肌丝断裂，肌小节 A 带、I 带结构特征性消失，Z 线、M 线模糊，排列紊乱，出现异常收缩带。姚季生等[10]也有类似发现，并认为异常收缩带对电击伤(死)的诊断有一定的价值。近年来也有学者通过免疫组化法对电击伤(死)进行了研究。刘小山[11]用免疫组化法研究了电击死心房中心钠素(ANP)的改变，结果发现电击死组的右心房中，ANP 颗粒明显减少。欧桂生等[12]用免疫组化法研究了电击死心肌组织中纤维连接蛋白的变化，结果发现电击死组纤维连接蛋白呈强阳性，而对照组为阴性。但因电损伤后心肌的病理变化缺乏特异性，故有人认为心脏电击后的病理变化不能用于诊断电击伤(死)[6]。马智华等[2]研究了电击伤后心肌组织基因表达谱的改变，发现电击后心肌组织核损伤因子 PEG-3 的表达明显增加。

PEG-3 是新近发现的一个与细胞损伤有关的基因，正常的鼠胚胎细胞核的损伤能诱导其表达；在癌细胞的转移及恶化过程中其表达也增多。但目前其在肿瘤方面的研究较多。本实验研究发现电击后 PEG-3 的表达明显，且有一定的时间相关性：电击伤组心肌细胞内在电击伤即刻即阳性染色，在 3h 时可见表达增加，12h 达到高峰，随后逐渐下降，第 12d 其值仍高于对照组；电击致死组在死后即刻就可见阳性表达，在 3h 时达到高峰，随后逐渐下降，12h 时也高于对照组；而死后电击组仅在死后即刻出现强表达，其他组及阴性对照组的表达则极其微弱，说明 PEG-3 可用于对电损伤的诊断，也可以对电击致死和死后电击进行鉴别。

由上可见，PEG-3 可用于对电损伤的诊断或作为对电损伤诊断的一个辅助指标，也可用于推断电损伤的时间，还可以对电击致死和死后电击进行鉴别。

参 考 文 献

[1] Su ZZ, Shi Y, Fisher PB. Subtraction hybridization identifies a transformation progression-associated gene PEG-3 with sequence homology to a growth arrest and DNA damage-inducible gene[J]. Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A, 1997;94(17):9125-9130.

[2] 马智华，万立华，潘守亭，等.利用基因芯片技术研究电击伤后心脏组织基因表达谱的改变[J]. 第三军医大学学报，2005;27(15):1561-1563.

[3] 李剑波，张佐才.电击伤与电击死[M]. 第 1 版.成都：成都科技大学出版社，1997.46-48.

[4] Puschel K. Ultrastructure lateration of skeletal muscles after electric shock[J]. Am J Forensic and pathol, 1985;39(1):145-150.

[5] Xu XH, Xu HQ, Zhu JZ. A preliminary study of skin electrical injury with computerized image analysis[J]. Forensic Sci Int, 1995;73(3):197-202.

[6] Lee RC. Injury by electric forces: pathophysiology, manifestations and therapy[J]. Curr-probl Surg, 1997;34(9):677-764.

[7] 李 江，马继任.电击伤的发病机理[J]. 前卫医学，1991;7(5):204-205.

[8] Xu WW. Arterial injuries in electrically burned upper limbs and effects of early reconstruction of blood circulation to the wrist[J]. Burns, 1982;8(6):379-386.

[9] 秦志强，龚毓昌，黄晓华.电损伤组织的超微结构观察[J]. 法医学杂志，2001;17(3):142-144.

[10] 姚季生，辛正翰，王 健，等.电击后心脏损伤的实验研究[J]. 中国法医学杂志，1997;12(1):12-15.

[11] 刘小山.电击死心房心钠素的免疫组化研究[J].法医学杂志，1998;14(3):144.

[12] 欧桂生，竞花兰，姜富学，等.电击死心肌组织中纤维连接蛋白的实验观察[J]. 中国法医学杂志，2002;17(5):277-278.

[13] 董 利，陈玉川，胡丙杰.电流损伤的病理学及发生机制研究的新进展[J]. 法医学杂志，2002;18(1):52-59.

(责任编辑：冉明会)