

人皮肤组织刺、切创后 IL-8 表达的免疫组织化学研究

官大威¹ 梅冰松² 于 舰³ 曲 忠⁴

(1. 中国医科大学法医学院, 辽宁 沈阳 110001; 2. 北京市公安交通管理部门事故处, 北京 100061; 3. 沈阳市公安局交通警察支队技术处, 辽宁 沈阳 110003; 4. 齐齐哈尔市公安局刑警支队技术处, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

摘要: 为探讨人皮肤刺、切创后白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8) 在推断皮肤损伤时间中的应用价值, 本研究应用免疫组化技术对 52 例不同损伤时间人体皮肤刺、切创组织中 IL-8 的表达进行了研究。伤后 4h 的损伤皮肤组织中可见部分的多核粒细胞表达 IL-8。伤后 12~24 h, 大部分浸润的多核粒细胞及部分单核细胞为 IL-8 阳性。随伤后时间延长, IL-8 阳性细胞以单核及成纤维细胞为主。伤后 4~6 h 的皮肤中, IL-8 阳性细胞比率较低, 为 $16.0 \pm 10.1\%$ 。伤后 1~4 d 达高峰, 为 $59.6 \pm 8.7\%$ 。其后逐渐减少。本研究结果表明, IL-8 的表达可用于皮肤刺、切创后损伤时间的推断。

关键词: 损伤时间推断; 免疫组织化学; 白细胞介素 8

An immunohistochemical study on the temporal expression of interleukin-8 in the incised and stabbed wounds in human skin GUAN Dawei, MEI Bingsong, YU Jian, et al. *Department of Forensic Pathology, School of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang 110001*

Abstract: To explore the applicability of interleukin-8 (IL-8) to determination of wound age in the incised and stabbed human skin samples, an immunohistochemical study on the temporal expression of IL-8 was performed on 52 human skin wounds at different posttraumatic intervals. Expression of IL-8 was detectable in polymorphonuclear cells (PMNs) in the wound specimens aged 4h. In the wound specimens aged from 12~24h after injury, IL-8 was identified in a large number of infiltrating PMNs and part of mononuclear cells (MNCs). Afterwards, the MNCs and fibroblastic cells (FBCs) accounted in the most part of the IL-8-positive cells. Morphometrically, the ratio of the number of the IL-8-stained PMNs, MNCs and FBCs to total number of the cells in the wounds was evaluated and calculated. The ratio of the IL-8-positive cells was low in the wound specimens aged 4 and 6h ($16.0 \pm 10.1\%$), and maximized in the wound specimens aged between 1 and 4 days ($59.6\% \pm 8.7\%$). Thereafter, the ratio decreased and minimized in the specimens aged from 19 to 21 days ($27.5 \pm 5.9\%$). The results suggest that IL-8 can be used as a marker for the wound age determination in both incised and stabbed human skin.

Key words: Wound age determination; Immunohistochemistry; Interleukin-8

损伤时间的推断是法医实践中的重要课题之一。迄今许多学者应用多种方法及指标对其进行了较广泛的研究, 包括利用生物化学或组织化学等手段测定损伤周边区的酶活性^[1]以及应用免疫组织化学染色技术检查某些细胞外基质成分, 如纤维连接蛋白和胶原纤维^[2,3]。近年来, 实验研究表明, 某些细胞因子, 如白细胞介素 1 α 或 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子等也可用于损伤时间的推断^[4,5]。

作者简介: 官大威 (1963-), 男, 辽宁熊岳县人, 博士, 副教授, 主要从事钝力性心脏外伤、心脏性急死及皮肤损伤愈合机制的研究。

本研究利用人体皮肤损伤标本, 通过免疫组织化学染色, 对 IL-8 在伤后不同时间的表达及其在推断皮肤损伤时间中的应用价值进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

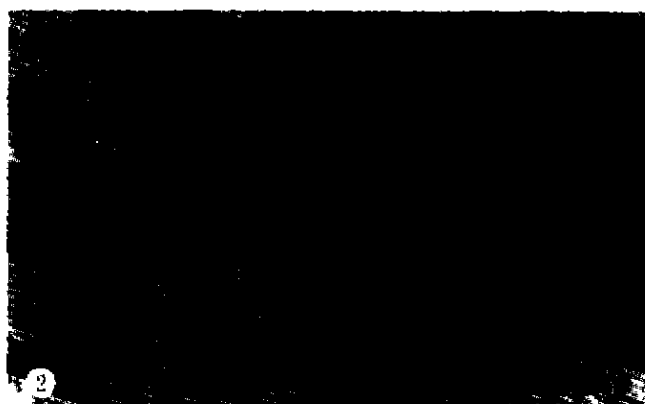
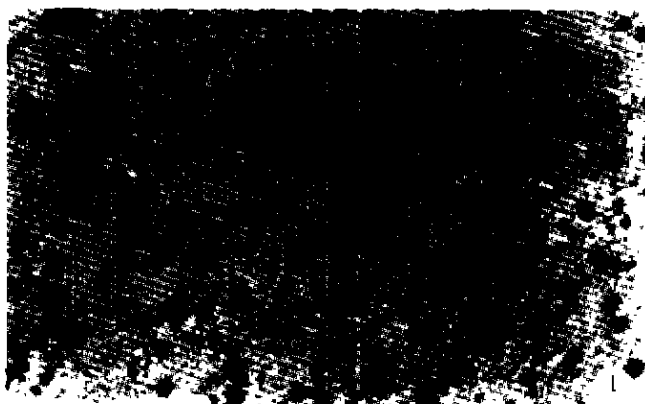
法医学尸体剖验中采取的人皮肤损伤组织 52 例。其中切创 32 例、刺创 20 例。男性 35 例, 女性 17 例, 年龄 7~77 岁 (平均 40.2 ± 19.8 岁)。损伤时间为伤后 0~21 d, 其中伤后 4 h 内 8 例、6 h 2 例、12 h 1 例、1 d 8 例、1.25 d 5 例、3 d 3 例、4 d 3 例、7 d 4 例、8 d 1 例、9 d 2 例、14 d 3 例、17 d 2 例、19

d 2 例、20 d 5 例及 21 d 3 例。所有案例解剖均在死后 3 d 内进行，解剖前尸体在 -4 ~ -20℃ 冰箱内保存。死者生前无患有营养不良、恶性疾患、代谢性疾病，治疗中也无使用过延缓细胞生长或类固醇药物等情况。每例中均采取损伤周围未受影响的皮肤做对照。

1.2 免疫组化染色

将皮肤标本固定于 4% PBS 缓冲液福尔马林中，经石蜡包埋后制成 4μm 切片，贴于硅化玻璃载片上干燥。切片脱蜡后放入含有 0.3% 过氧化氢甲醇溶液中，灭活组织中内源性过氧化物酶活性。经 PBS 净洗后，将切片放入 pH 6.0 的柠檬酸缓冲液中，微波炉中加热至 90℃ 10 min 以修复抗原。切片冷却至室温后，PBS 净洗，滴加 1:100 倍稀释的抗人 IL-8 单克隆抗体 (IgG₁, Genzyme, USA) 保湿合内室温下孵育 60 min。PBS 净洗后，滴加标有过氧化物酶的羊抗兔 IgG 抗体 (EnVision™ 系统, Dako)，用 DAB 显色并做核复染。每次染色中均以 PBS 或正常小鼠 IgG₁ 替代一抗做阴性对照。常规做 HE 染色。

1.3 阳性细胞计数分析



照片 1. 皮肤切创 24h 后阳性中性多核白细胞 (矢状箭头示) 和单核细胞 (三角箭头示) (IL-8 免疫组化染色 ×200)；
照片 2. 皮肤切创 7 d 后 IL-8 阳性成纤维细胞 (三角箭头示) (IL-8 免疫组化染色 ×400)

Photo 1. The IL-8-positive polymorphonuclear cells (arrows) and mononuclear cells (arrowheads) 24h post-wounding in skin (Immunostaining of IL-8, ×200); Photo 2. The IL-8-positive fibroblasts (arrowheads) 7d post-wounding in skin (Immunostaining of IL-8, ×400)

2.2 阳性细胞计数分析

图 1 为不同损伤时间后 IL-8 阳性细胞的百分率。伤后 6 h 之内，IL-8 阳性细胞的比率较低 (16.0 ± 10.1%)。损伤 12 h 组，阳性细胞比率明显增高 (55.6 ± 6.5%) 伤后 1~4 d，IL-8 阳性细胞比率最高 (59.6 ± 8.7%)。伤后 7~9 d，比率下降 (49.3 ± 5.3%)。伤后 14 及 17 d 组中，该比率继续下降 (47.5 ± 10.0%，38.8 ± 2.8%)。伤后 19~21 d，阳性细胞比率最低 (27.5 ± 5.9%)。经统计学 t 检验，伤后 1~4d 各组的阳性细胞率与其它时间组相比较

显微镜 ×200 倍率下，在每张切片中随机选择 10 个视野计数包括多核粒细胞、单核细胞及成纤维细胞的阳性细胞，计算每个视野中阳性细胞与此三种细胞总数的百分比值，并做 t 检验，数据应用 SPSS for Windows 软件包进行分析，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 免疫组化染色

2.1.1 对照组皮肤染色 对照组标本中，表皮层的棘细胞，基底细胞以及真皮层的汗腺细胞胞质呈 IL-8 阳性。

2.1.2 损伤组皮肤染色 伤后 3 h 内的标本中，无炎细胞浸润。伤后 4 h 组，损伤周边区有少数中性粒细胞浸润，并可见细胞质呈 IL-8 阳性。伤后 12~48 h 切片中可见大量浸润的白细胞，包括多核粒细胞及单核细胞，均表达 IL-8 (照片 1)。伤后 3~4 d，IL-8 阳性细胞以单核细胞为主及部分成纤维细胞。伤后 1 周的切片中 IL-8 阳性细胞以成纤维细胞为主 (照片 2)，新生的毛细血管内皮细胞也表达 IL-8。

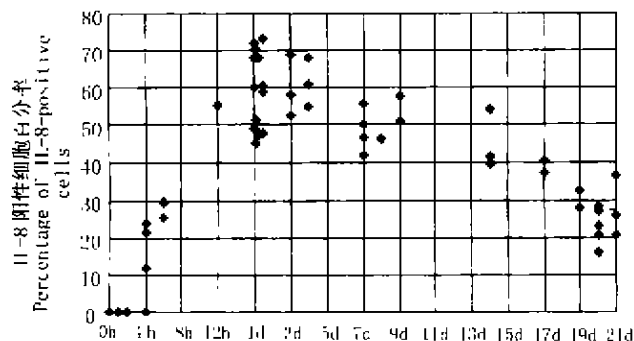


图 1. 人皮肤损伤后不同时间 IL-8 阳性细胞的百分率
Fig 1. The percentage of IL-8-positive cells at different wound ages in human skin

均有显著差异 ($P < 0.05$ 或 0.01)。

3 讨论

IL-8 属于化学趋化性细胞因子, 具有激活中性粒细胞的功能。其生物学效应与血浆源性过敏毒素 C5a、细胞源性白三烯 B₄ 等化学趋化因子相似^[5]。多种细胞, 如内皮细胞、成纤维细胞、上皮细胞及平滑肌细胞等均可产生和释放 IL-8^[6]。IL-8 可趋化中性粒细胞、T 细胞和角质细胞, 并促进上皮细胞和白细胞增生, 在皮肤损伤后愈合过程中起着重要作用。

本实验研究中应用免疫组化技术证明皮肤损伤区中性粒细胞、单核细胞及成纤维细胞在皮肤损伤愈合过程中均表达 IL-8。其阳性细胞比率随伤后时间不同而表现出有规律性地变化。阳性细胞比率在伤后 1~4 d 组达到最高值。更重要的是, IL-8 可耐受使蛋白质变性和灭活的多种处理因素, 如高热、强酸和强碱、除垢剂以及有机溶剂等^[7]。IL-8 对多肽酶类也具有耐受性。只在 37℃ 下可被弹力酶及 cathepsin G 缓慢灭活^[8, 9]。众所周知, 法医实践中多数情况下, 尸检材料均会受到死后变化的影响, 而 IL-8 的理化特性表明其在法医学实践中应用的可行性。另外, 本研究中在损伤时间相同或相似的标本中, IL-8 的免疫染色强度在不同年龄组中亦未发现有明显变化, 如伤后 1~4 d 的标本中虽然 IL-8 阳性细胞的比率不同, 但阳性细胞的染色强度未见变化。因此, IL-8 的免疫组化染色可作为一种指标用于损伤时间的判定。但本研究中未进行细胞种类的标记性染色, 如果分别对皮肤伤后不同时间中性粒细胞、巨噬细胞及成纤维细胞等不同种类细胞以及人体不同部位皮肤损伤后这些细胞 IL-8 表达的变化进行细致的研究, 可能会更准确地判定损伤时间, 并且比单纯通过组织学观察这些细胞数量变化更有意义, 从而成为法医学实践中判定损伤时间的可靠而实用的指标之一。

免疫组化染色已成为常规组织学检测技术, 虽然染色中需用微波炉进行抗原修复, 但这一技术容易掌握, 早已在免疫组化染色中推广和应用^[10]。应当指

出的是, 免疫组化染色应在相同和标准化的条件下进行, 以保证实验结果的可靠性。

参 考 文 献

- 1 Raekallio J. Determination of the age of wounds by histochemical and biochemical methods. *Forensic Sci Int*, 1972, 1: 3
- 2 Betz P, Nerlich A, Wilske J, et al. Immunohistochemical localization of fibronectin as a tool for the age determination of human skin wounds. *Int J Legal Med*, 1992, 105: 21
- 3 Betz P, Nerlich A, Wilske J, et al. Analysis of the immunohistochemical localization of collagen type III and V for the time-estimation of human skin wounds. *Int J Legal Med*, 1993, 105: 329
- 4 Kondo T, Ohshima T. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound; a preliminary study for possible wound age determination. *Int J Legal Med*, 1996, 108: 231
- 5 Kondo T, Ohshima T, Eisenmenger W. Immunohistochemical and morphometrical study on the temporal expression of interleukin-1 α (IL-1 α) in human skin wounds for forensic wound age determination. *Int J Legal Med*, 1999, 111: 149
- 6 Damme JV. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. In: Thomson AW; *The cytokine handbook*. Academic Press Ltd. London, 1994, 186
- 7 Baggolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*, 1994, 55: 97
- 8 Peven P, Walz A, Dewald B, et al. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, 1988, 167: 1547
- 9 Padrines M, Wolf M, Clark-Lewis I, et al. Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and protein-3. *FEBS Lett*, 1994, 352: 231
- 10 Shu SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*, 1991, 39: 741 (2001-02 收稿, 2001-04 修回)