

## 大鼠皮肤切创愈合过程中 ICAM-1 及 P 选择素的表达

陈志明<sup>1</sup> 汪德文<sup>1</sup> 吴旭<sup>1</sup> 张国华<sup>1</sup> 杜宇<sup>1</sup> 张巍<sup>2</sup> 曹红十<sup>3</sup> 李畅<sup>4</sup>

(1. 中国医科大学法医学院, 辽宁 沈阳 110001; 2. 沈阳市公安局交警支队, 辽宁 沈阳 110003;

3. 吉林大学附属一院神经外科, 吉林 长春 130021; 4. 郑州市公安局刑警支队, 河南 郑州 450000)

**【摘要】目的** 探讨细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) 及 P 选择素的表达变化与损伤时间的关系。**方法** 应用免疫组织化学技术, 对实验大鼠不同损伤时间的生前伤 (5min~7d) 及死后伤 (5~30min) 皮肤组织中 ICAM-1 及 P 选择素的表达变化进行观察。**结果** 在生前损伤组中, ICAM-1 最早在伤后 1h, 最迟至伤后 3d 在表皮层中呈阳性表达; P 选择素最早在伤后 10min, 最迟至伤后 5h 即在血管内皮细胞中呈阳性表达。此外, ICAM-1 还在炎症细胞及纤维母细胞中表达, 且随损伤时间变化而呈规律性变化。在时间段分组, ICAM-1 在第 1 组 (5min~1h) 中阳性细胞率极低 (0.41 ± 0.73%), 第 2 组 (3h~7h) 及第 3 组 (9h~12h) 均呈显著性增高 (9.79 ± 3.74%, 23.33 ± 1.10%), 至第 4 组 (1d) 达高峰 (30.58 ± 2.65%), 其后逐渐减少。ICAM-1 及 P 选择素在死后伤中均呈阴性表达。**结论** ICAM-1 及 P 选择素可作为法医学损伤时间判定的有效指标。

**【关键词】** 法医病理学; 皮肤损伤; 细胞间粘附分子-1; P 选择素; 免疫组织化学; 损伤时间推断

**The expression of ICAM-1 and P-selectin in the healing process of incised wounds of rats /** CHEN Zhiming, WANG Dewen, WU Xu, et al. / *China Medical University, School of Forensic Medicine, Shenyang 110001*

**【Abstract】Objective** Explore the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and P-selectin in the healing process for possible application in timing of incised wounds. **Method** An immunohistochemical study on the expression of ICAM-1 and P-selectin was performed on rats vital skin incised wounds (5min~7d) using postmortem incisions (5~30min) as control. **Results** In the vital skin incisions, positive stain of ICAM-1 was observed on epidermis began from 1h and lasted till 3d, while the P-selectin stain was observed on vascular endothelium as early as 10min after incision and lasted 5h; in addition, the expression of ICAM-1 was also found in the inflammatory cells and fibroblasts, the lasting period varied from group to group (group 5min~1h, group 3~7h, group 9~12h, group 1d, group 3d, group 5~7d.). The positive ratios of ICAM-1 among the cells were very low in group 1 (0.41 ± 0.73%), and increased considerably in group 2 (9.79 ± 3.74%) and group 3 (23.33 ± 1.10%), maximized in group 4 (30.58 ± 2.65%), then decreased in group 5 and 6. There were no changes of ICAM-1 and P-selectin in the postmortem incision group. **Conclusion** ICAM-1 and P-selectin are considered potentially useful markers for wound age determination in forensic practice.

**【Key words】** Forensic pathology; Skin injury; ICAM-1; P-selectin; Immunohistochemistry; Timing of wound age

粘附分子 (intercellular adhesion molecule, ICAM) 是一类介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间粘附作用的膜表面糖蛋白。ICAM-1 和 P 选择素分别属于粘附分子中的免疫球蛋白超家族和选择素家族,前者为 LFA-1 的配体,与 LFA-1 相互作用可介

导上皮细胞与淋巴细胞间的粘附,介导单核巨噬细胞、中性粒细胞的粘附,以及为细胞粘附所必需,参与抗原呈递和 T 细胞活化、炎症反应和移植排斥反应<sup>[1,2]</sup>;后者主要参与介导白细胞与内皮细胞的起始粘附,其与白细胞上的配体结合,从而介导白细胞的滚动作用,并将其锚定于内皮细胞上,进而诱导稳定的粘附作用<sup>[2]</sup>。有关 ICAM-1 的法医病理学研究,主要集中在判定心肌缺血及脑损伤时间可行性方面<sup>[3]</sup>,

**【作者简介】**陈志明 (1977 - ),男,吉林长春市人,在读硕士,主要从事皮肤损伤时间鉴定的研究。

对其在判定皮肤切割创损伤时间方面的研究很少。P选择素在法医学的应用,国内几乎未见报道<sup>[4]</sup>。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 ICAM-1 及 P 选择素的表达变化,以期确定两者的表达与损伤时间变化的规律,为皮肤损伤时间判定提供有效的免疫组织化学指标。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物分组与样本制作

**1.1.1 活体损伤组** 取雄性健康 SD 大鼠 39 只,随机分为 13 组,每组 3 只。剪毛后,在背部切长 3cm 创口,深达肌层,分别于伤后 5min, 10min, 30min, 1h, 3h, 5h, 7h, 9h, 12h, 1d, 3d, 5d, 7d 将大鼠断颈处死,于伤口边缘处取 1.5 × 3cm 皮肤组织。

**1.1.2 死后伤组** 取 9 只雄性健康 SD 大鼠,随机分为 3 组,每组 3 只。断颈处死后,在背部切长 3cm 口,深达肌层,分别于死后 5min, 10min, 30min 取与致伤大鼠相同部位皮肤作为对照。

**1.1.3 正常对照组** 取 3 只雄性健康 SD 大鼠,断颈处死后,取与致伤大鼠相同部位皮肤作为对照。

上述皮肤样本,取材后均放入 4% 多聚甲醛 PBS 中固定 12h,石蜡包埋、切片(厚度为 5μm)后进行染色:(1)常规 HE 染色;(2)免疫组织化学染色。1) 石蜡切片常规脱蜡至水;2) 3% 的过氧化氢-甲醇孵育 10min,微波抗原修复;3) 3% 正常山羊血清孵育,室温下 20min;4) 加入适当稀释的一抗(ICAM-1, 1:200; P 选择素, 1:100), 4 过夜;5) 滴加生物素标记的二抗,室温下 20min;6) 滴加三抗,室温孵育 20min;7) DAB 显色 5~10min,水洗,苏木素复染、透明、中性树胶封片。

### 1.2 主要试剂

兔抗鼠 ICAM-1 多克隆抗体、兔抗鼠 P 选择素多克隆抗体,以及 SABC 免疫组织化学试剂盒均由武汉

博士德公司提供。

### 1.3 ICAM 阳性细胞计数及统计学分析

显微镜(×400)下,每张切片随机选择 10 个视野数多核粒细胞、单核细胞和成纤维细胞的阳性细胞数,计算每个视野中阳性细胞与此 3 种细胞总数的比值。采用 SPSS for windows 10.0 软件包,应用方差分析进行统计学分析,数据应用  $\bar{x} + s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 创口愈合过程中的免疫组织化学改变

**2.1.1 对照组和死后伤组** 皮肤染色 ICAM-1 在正常皮肤的表皮层、毛囊、皮脂腺中呈淡黄色染色;在死后伤组皮肤样本,毛囊及皮脂腺着色较淡或不表达。P 选择素在正常皮肤及死后伤组皮肤样本均未见表达。

**2.1.2 损伤组皮肤染色** 伤后 1h,可见大鼠损伤边缘处表皮, ICAM-1 呈黄褐色染色。伤后 3h, ICAM-1 在表皮层中呈深黄褐色,尤以基底细胞及棘细胞;在毛囊,皮脂腺的染色亦增强(照片 1)。上述变化一直持续至伤后 1d。伤后 3d, ICAM-1 染色转淡,呈黄褐色。伤后 5d 及 7d, ICAM-1 表达基本恢复至正常状态。

在创缘底部,伤后 3h 即可见炎症细胞浸润,以中性粒细胞为主,其细胞质及细胞膜 ICAM-1 呈阳性表达。在伤后 12h,可见大量浸润的白细胞,以多核粒细胞为主,并可见有单核细胞, ICAM-1 在其均见表达(照片 2)。伤后 3d, ICAM-1 主要在单核细胞表达,伤后 5d 及 7d, ICAM-1 只在部分单核细胞和成纤维细胞表达。

P 选择素在伤后 10min 即可见在皮肤阳性表达,主要在创缘底部毛细血管内皮细胞及白细胞上,并一直持续至伤后 5h 组(照片 3)。伤后 7h, P 选择素已恢复至正常状态。



照片 1. 伤后 3h, ICAM-1 在表皮层中呈阳性染色 ×200; 照片 2. 在伤后 12h, 可见大量浸润的炎症细胞, 其中可见有 ICAM-1 表达 ×200; 照片 3. 伤后 10min, P 选择素在血管内皮细胞中的表达 ×200

**Photo 1.** In this 3-h old skin wound, epidermis is immunostained with anti-ICAM-1 antibody. ×200; **Photo 2.** A 12h old skin wound with infiltration of inflammatory cells showing positive reaction for ICAM-1. ×200; **Photo 3.** In this 10-min old skin wound, endothelium of blood vessel shows positive reaction for P-selectin. ×200

## 2.2 ICAM 阳性细胞计数及统计学分析

图 1 为不同损伤时间后 ICAM-1 阳性细胞的百分率。观其不同时间段变化, 可分 6 组 (图 2): ( ) 伤后 1h 内, ICAM-1 几乎未见表达 ( $0.41 \pm 0.73\%$ ); ( ) 伤后 3h~7h, ICAM 阳性细胞比率明显增高 ( $9.79 \pm 3.74\%$ ); ( ) 伤后 9h-12h 持续升高 ( $23.33 \pm 1.10\%$ ); ( ) 伤后 1d ICAM 达峰值 ( $30.58 \pm 2.65\%$ ); ( ) 伤后 3d 阳性细胞比率有所下降 ( $21.2 \pm 1.2\%$ ); ( ) 伤后 5d-7d 其阳性细胞比率为 ( $4.52 \pm 0.4\%$ )。经统计学  $t$  检验, 相邻两组阳性细胞率均存在显著差异, 且各组与第 IV 组比较阳性细胞率亦存在显著差异 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。

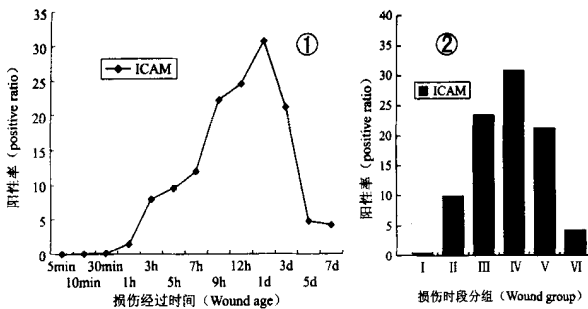


图 1. 大鼠皮肤损伤后不同时间 ICAM 百分率; 图

## 2. 各损伤组 ICAM-1 平均值及阳性细胞的标准误

Fig 1. Ratio of positive cells in relation to the wound age of rat skin; Fig 2. Mean values and standard errors in each wound group for ICAM-1

## 3 讨论

由于皮肤经常接受各种外来刺激, 需要相对较快的细胞更新, 在正常皮肤中出现 ICAM-1 的表达, 经免疫组化染色, 其表皮层、毛囊、皮脂腺中呈淡黄色染色。说明 ICAM-1 在维持皮肤生物学稳态方面有重要作用<sup>[5]</sup>。本研究结果显示: 皮肤损伤后表皮层 ICAM-1 表达增高, 且呈现一定时间规律性。这可说明角质形成细胞可表达 ICAM-1<sup>[6]</sup>和 ICAM-1 在角质形成细胞的再生过程中有着重要作用。有学者认为, 特定粘附分子及其相应配体的表达水平和结合的亲和力是不同类型炎症发生过程中重要的分子基础<sup>[2,6]</sup>, 在炎症起始阶段, 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。本研究免疫组化技术证明: 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 ICAM-1, 血管内皮细胞也可见 ICAM-1 的表达, 恰恰证实了上述观点; 同时, 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, ICAM-1 在损伤后 12h 至 3d 达峰值, 与炎症反应高峰

期时相相符合, 再次证明了 ICAM-1 在损伤愈合的炎症期起着不可替代的生物学作用<sup>[7]</sup>。

P 选择素在伤后 10min 即在皮肤创缘底部毛细血管内皮细胞及部分白细胞上呈阳性表达, 并一直持续至伤后 5h; 至伤后 7h, 恢复正常状态。说明 P 选择素在介导白细胞与内皮细胞的起始粘附中有重要作用<sup>[2]</sup>。

应用免疫组化方法判定损伤时间, 以及活性有一定的限制, 主要是因为缺少损伤修复初期的标记物<sup>[8]</sup>。本研究证实: ICAM-1 和 P 选择素可作为损伤时间判定的有效指标, 尤其是 ICAM-1, 伤后不仅在表皮角质细胞中随时间变化呈现规律性表达, 其在多核粒细胞、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, 并在 6 个时间段中均存在显著差异; P 选择素在伤后 10min 内即可出现, 且在死后伤中未见表达, 其在判定死后伤与生前伤方面, 无疑具有非常重要的意义。

尤为值得提出的是, 以 ICAM-1 及 P 选择素做为指标的免疫组化方法方便, 不需特殊的实验条件, 且对石蜡切片一样有效, 可作为法医学皮肤损伤时间判定的有效指标。将此两种指标综合应用, 可提高损伤时间判定的准确性和客观性。

## 参考文献

- 1 Heufelder AE, Dutka DB, Hillegas LM, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in sera of patients with Graves ophthalmopathy and thyroid diseases [J]. Clin Exp Immunol, 1993, 92: 296
- 2 龚非力. 基础免疫学 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 10
- 3 刘敏, 廖志钢, 李梅, 等. 液冲击脑损伤后细胞间粘附分子表达的研究 [J]. 法医学杂志, 2002, 18 (1): 12
- 4 J Dre ler, Bachmann L, Koch R, et al. Enhanced express of selectins in human skin wounds [J]. Int J Legal Med, 1998, 112: 39
- 5 Kita M. Physiological significance of cytokines [J]. J Clin Exp Med, 1995, 174: 1141
- 6 J Dre ler, Bachmann L, Müller E, et al. Time dependence of the expression of ICAM-1 (CD54) in human skin wounds [J]. Int J Legal Med, 1997, 110: 299
- 7 Kondo T, Ohshima T. Immunohistochemical detection of chemokines in human skin wounds and its application to wound age determination [J]. Int J Legal Med, 2002 116: 87
- 8 Bankfalvi A, Riehemann K, Finner D, et al. Feuchtes ar toklavieren [J]. Pathologie, 1994: 15: 345

(2003-03 收稿, 2003-06 修回)