

小鼠近死亡期皮肤损伤活性的 FTIR 光谱研究

黄平¹, 杨广德³, 托娅^{1,2}, 王振原^{1*}

1. 西安交通大学法医学系, 陕西 西安 710061
2. 西安交通大学法医学国家重点学科实验室, 陕西 西安 710061
3. 西安交通大学药理学系, 陕西 西安 710061

摘要 应用傅里叶变换红外(FTIR)光谱分析研究了近死亡期皮肤损伤活性差异。生前 5 min 组, 死后 5 min 组, 正常组的 FTIR 光谱的峰形、峰高有明显差异: (1)与脂类有关的 3 007 和 1 745 cm^{-1} 谱带的峰高, 生前伤比死后伤增强。(2)与碳水化合物相关谱带 1 160 cm^{-1} 的峰高, 生前伤比死后伤明显升高。(3)1 640 cm^{-1} 谱带为蛋白质相关的酰胺 I 带, 损伤组峰高要低于正常组, 生前伤中最低。这一结果表明, FTIR 光谱分析技术有望成为法医近死亡期皮肤损伤活性判定的有效方法。

关键词 FTIR; 生前伤; 死后伤

中图分类号: DF795.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)06-1074-03

引言

法医学实践中皮肤损伤活性的判定(生前伤与死后伤判定)是一项十分重要的内容。损伤活性的确定为嫌疑人、案发现场推断, 案件侦破起到关键作用。国内外法医学者对损伤活性判定通常采用病理形态学检查(普通 HE 染色, 免疫组织化学, 电镜等技术)^[1-4]。但近死亡期皮肤损伤由于损伤与死亡接近, 故虽然生物组织及组织内生物分子发生变化, 但通过病理形态学方法却无法检测其差异。因此近死亡期皮肤损伤活性判定在法医实践中常得不到有效的解决^[5]。

构成组织和细胞的基本物质是蛋白质、糖、脂肪、核酸等, 因此细胞和组织红外光谱是这些生物分子相互叠加的结果, 红外光谱反映了它们的组成含量、构象及其发生的变化。傅里叶变换红外光谱(FTIR)能准确灵敏地对细胞内生物物质相应基团分子振动水平变化进行检测, 且特异性高、操作简便, 已经被广泛地运用多个领域^[6-14]。

本研究从近死亡期损伤的实验动物模型入手, 将 FTIR 技术引入法医损伤研究领域, 分析近死亡期小鼠皮肤生前伤和死后伤 FTIR 结果差异, 从而为近死亡期皮肤损伤活性推断提供可行的检测方法。

1 实验部分

1.1 法医近死亡期皮肤损伤实验动物模型建立

健康清洁级 ICR 雄性小鼠 24 只, 体重(28±5)g, (西安

交通大学医学动物实验中心提供)。动物试验遵守《国际实验动物保护原则》(U. S. 1985)。采取随机分组法, 将实验动物分为正常对照组和生前损伤组(生前 5 min 致伤), 死后损伤组(死后 5 min 致伤), 每组 8 只。0.4% 戊巴比妥钠(1 mL · kg⁻¹), 腹腔注射麻醉。小鼠固定于实验动物台, 去除背部毛发, 常规手术消毒。手术刀在其背部切创(长 1 cm, 深达肌层表面), 按设定分组类型取切创缘皮肤组织, 小鼠断颈处死。24 例样本分为两等份。一份 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 进行组织病理学观察。一份样本迅速放置于液氮中保存, 待 FTIR 检测。

1.2 测量方法

取出液氮保存组织, -50 °C 真空冻干, 取少量冻干组织研磨后添加 KBr 粉末研匀压片。用 Shimadzu 公司生产的 FTIR-8400S 型傅里叶红外光谱仪, 在 4 000~400 cm^{-1} 范围内扫描, 扫描次数累计 16 次, 分辨率 4 cm^{-1} 。

1.3 数据处理与分析

红外光谱图处理与分析运用 Shimadzu 公司提供的 IRsolution Version 1.10 软件, 测量红外光谱中各个谱带峰位、峰高, 计算谱带间相对峰高的比值。采用 SPSS 11.5 统计软件对所得数据进行 Kruskal-Wallis H 秩检验。

2 结果与讨论

2.1 近死亡期损伤皮肤、正常皮肤的 FTIR 谱图

在 4 000~400 cm^{-1} 频率范围内测定生前伤、死后伤、正

收稿日期: 2006-04-16, 修订日期: 2006-07-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471935)和西安交通大学博士基金项目(N160, 071206)资助

作者简介: 黄平, 1979 年生, 西安交通大学法医学系博士研究生 * 通讯联系人 e-mail: wzy218@mail.xjtu.edu.cn

常组织的 FTIR 图谱,其主要振动峰位、相对峰高比见表 1。

Table 1 Comparison of FTIR spectra of vital, postmortem and normal tissues

指标	生前损伤组	死后损伤组	正常组
P3 307.00	3 310.83±7.98	3 308.66±6.84	3 309.86±9.25
P3 075.00	3 074.32±4.00	3 077.94±2.81	3 075.05±5.73
P3 007.00	300 8.75±0	3 008.99±0.68	3 009.23±0.89
P2 925.00	2 924.36±1.36	2 925.33±2.47	2 928.46±10.76
P2 853.00	2 854.45±0	2 853.97±0.89	2 853.97±0.89
P1 740.00	1 745.7±0.68	1 745.46±1.03	1 745.46±0
P1 550.00	1 543.91±1.46	1 544.15±3.41	1 542.47±0.89
P1 460.00	1 456.64±0.89	1 457.12±1.03	1 456.88±0.99
P1 160.00*	1 163.72±0.99	1 164.68±0.68	1 164.2±0.99
P1 080.00*	1 085.97±0.89	1 080.43±4.60	1 081.875±5.40
H3 075/H3 007*	0.58±0.28	1.58±1.36	1.52±1.39
H2 925/H2 853	2.37±0.20	2.50±0.59	2.50±0.47
H1 640/H1 740*▲	1.47±0.33	2.30±0.97	2.81±2.44
H1 460/H1 400*	2.67±0.45	2.05±0.25	2.58±0.47
H1 241/H1 160*▲	1.24±0.29	2.67±1.44	3.13±2.16

注: P 代表谱带的峰位, H 代表谱带的峰高; * 表示生前与死后伤有差异, $P < 0.05$; ▲ 表示三组都有差异, $P < 0.05$

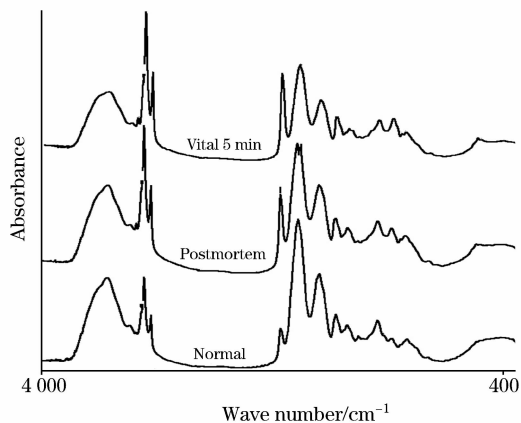


Fig. 1 FTIR spectra of normal (low), vital (upper), postmortem (middle) tissues

2.2 三组 FTIR 红外光谱比较

比较生前伤、死后伤的皮肤组织红外光谱图,可以发现尽管在病理形态学上两者并无差异,但是生前伤、死后伤在 FTIR 图上的峰位、峰高具有显著的差别,见图 1 和图 2。第一, 3 307~2 853 cm^{-1} 峰位范围内出现了 5 个吸收峰,其位置没有明显差异。3 007 cm^{-1} 处,生前伤较死后伤、正常组峰高有明显的增强。生前伤的 H 3075/H 3007 较死后伤显著下降 ($P < 0.05$),死后伤与正常组无明显差异。三组的 H2 925/H2 853 均无差异。第二,在 1 740~1 400 cm^{-1} 内有 5

个吸收峰,三组峰位无差异。H1 640/H1 740 在三组之间均有明显差异,生前伤最低;生前伤的 H1 460/H1 400 要高于死后伤,但与正常组相比无差异。第三,在 1 241~1 080 cm^{-1} 范围内,出现 4 个吸收峰。生前伤 1 080 cm^{-1} 谱带较死后伤向高波数方向移位。三者 H1 241/H1 160 比值,有明显不同,生前伤最低,正常组最高 ($P < 0.05$)。第四,比较生前伤、死后伤、正常组皮肤组织的峰位、相对峰高比,发现它们的峰位没有显著差异,仅 1 160 和 1 080 cm^{-1} 两处峰位有所不同,这说明生前伤、死后伤中分子构像没有很大的变化,同时也说明过短损伤时间内组织中分子构像变异还未进行或变异很少。这也证实了病理形态学上差异是由其组织细胞内分子结构变化决定的。而相对峰高比值有显著差异,说明不同分子成分含量在近死亡期损伤发生变化。比较发现,与碳水化合物相关谱带 1 160 cm^{-1} 的峰高在损伤后均比正常组高。1 640 cm^{-1} 谱带为蛋白质相关的酰胺 I 带,损伤组要低于正常组,生前伤中最低,说明近死亡期损伤,生物体可能会对蛋白合成抑制,分解增强。与脂类有关的 3 007 和 1 745 cm^{-1} 谱带峰位,生前伤比死后伤增强。与核酸有关的 1 241 和 1 080 cm^{-1} 谱带峰高三组间没有变化,可能是在短时间内 DNA 合成未受影响。这也证实了损伤时间过短组织处于受损阶段,而未进入修复阶段,这符合机体损伤修复的病理基础。

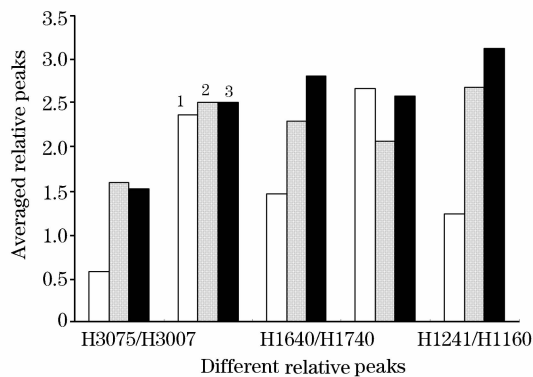


Fig. 2 Relative intensities of FTIR spectra of vital, postmortem and normal skin tissues in mouse
1. vital, 5 min; 2. postmortem; 3. Normal

3 结 论

通过对近死亡期皮肤生前伤、死后伤、正常组的比较,可以发现由于所含的化学成分及各成分的含量有所改变,均可得到自己的特征吸收峰,有独特的 FTIR 光谱图。病理形态学上无法检测近死亡期的生前伤、死后伤差异,而 FTIR 光谱却能在峰形、峰高上检测到明显的不同。本研究为后期法医实践提供了初步实验基础。同时 FTIR 光谱在法医组织学研究领域中有望成为有效的检测方法。

参 考 文 献

- [1] Ortiz-Rey J A, Suarez-Penaranda J M J, Munoz-Barus I. *Int. J. Legal Med.*, 2003, 117: 356.
- [2] Takahito Hayashi, Yuko Ishida, Akihiko Kimura. *Int. J. Legal Med.*, 2004, 118: 320.
- [3] Dressler J, Busuttill A, Koch R, et al. *Int. J. Legal Med.*, 2001, 115: 61.
- [4] Kondo T, Ohshima T, Mori R, et al. *Int. J. Legal Med.*, 2002, 116: 87.
- [5] Dressler J, Bachmann L, Strejc P, et al. *Forensic Sci. Int.*, 2000, 113: 173.
- [6] MA Hua-cheng, HUANG Yong, LEI Hua(马华成, 黄 勇, 雷 华). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2001, 21(4): 468.
- [7] YANG Jiao-lan, LUO Tian(杨娇兰, 罗 添). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2002, 22(4): 610.
- [8] LING Xiao-feng, XU Zhi, XU Yi-zhuang, et al(凌晓锋, 徐 智, 徐怡庄, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(2): 198.
- [9] Zhou J B, Wang Z, Sun S Q, et al. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2001, 33: 127.
- [10] Wong P T, Goldstein S M, Grekin R C, et al. *Cancer Res.*, 1993, 53 (4): 762.
- [11] LI Wei-xiu, ZHENG Quan-qing, WANG Ping, et al(李炜修, 郑全庆, 王 平, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(10): 1833.
- [12] WU Jin-guang(Editor)(吴瑾光主编). *The Techniques and Application of Modern Fourier Transform Infrared Spectroscopy(近代傅里叶变换红外光谱技术及应用)*. Beijing: Literature Press of Science and Technology(北京:科学技术文献出版社), 1994.
- [13] N Mizrachi, Z Aizenshtat, S Levy, et al. *J. Forensic Sci.*, 1998, 43(2): 353.
- [14] Zieba-Palus J, Kunicki M. *Forensic Sci. Int.*, 2006, 158: 164.

The Analysis of Vital Reaction Following Skin Injury Close to Death in Mouse by FTIR

HUANG Ping¹, YANG Guang-de³, TUO Ya^{1, 2}, WANG Zhen-yuan^{1*}

1. Department of Forensic Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

2. Laboratory of National Key Subject for Forensic Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

3. Department of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was applied to study the difference of vital reaction following skin injury close to death in mouse and provided the evidence for forensic practice. The results demonstrated that vital 5 min, postmortem and normal groups showed significant differences in the wave form and intensity: (1) The intensity at 3 007 and 1 745 cm^{-1} related to lipid for the vital injury was higher than that for the postmortem; (2) The intensity at 1 160 cm^{-1} related to carbohydrate for the vital injure increased more compared to the postmortem; (3) The intensity of the band at 1 640 cm^{-1} related to amide I band for the injury groups was higher than the normal, but it was the lowest for the vital injury. These results show that it will be possible for FTIR to become an effective method to determine the vital reaction of injury close to death in forensic practice.

Keywords FTIR; Vital injury; Postmortem injury

(Received Apr. 16, 2006; accepted Jul. 28, 2006)

* Corresponding author