

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.2014.01.010

电击死大鼠骨骼肌肌肉细胞特异性泛素蛋白连接酶 1-mRNA 表达的法医学研究

袁增琼, 万立华

(重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究电击死早期骨骼肌肌肉细胞特异性泛素蛋白连接酶 1 (muscle-specific RING finger protein 1, MuRF1)-mRNA 随时间的变化规律及其在鉴别生前电击死与死后电击中的应用。**方法:**60 只健康的 Wistar 大鼠, 雌雄不限, 每组 20 只。电击死组大鼠用 220 V 交流电的两极分别连接右前肢与左后肢, 通电 90 s 致死, 于电击死后 0、1、3、6 h 取材; 死后电击组大鼠采用颈椎脱臼法处死后, 分别于 0、1、3、6 h 电击 90 s 取材; 空白对照组大鼠直接颈椎脱臼法处死, 不进行电击, 于死后 0、1、3、6 h 取材。用 RT-PCR 技术检测各组大鼠左后肢腓肠肌、胫骨前肌 MuRF1-mRNA 表达水平。**结果:**电击死组大鼠左后肢腓肠肌 MuRF1-mRNA 表达量于死后即刻升高, 1、3 h 下降, 与空白对照组相比差异有统计学意义 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$), 6 h 低于空白对照组 ($P=0.925$); 电击死组大鼠左后肢胫骨前肌 MuRF1-mRNA 表达量于死后即刻升高, 1 h 达峰值, 3 h 开始降低, 与空白对照组相比差异均有统计学意义 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$); 死后电击组左后肢腓肠肌、胫骨前肌较空白对照组高, 但升高不如电击死组显著; 电击死组、死后电击组左后肢胫骨前肌 MuRF1-mRNA 含量均较腓肠肌高。**结论:**大鼠电击死 6 h 内左后肢骨骼肌 MuRF1-mRNA 在 I 型肌纤维、II 型肌纤维中的表达量不同, 且其表达具有时间规律性, 可为电击死早期死亡时间推断提供一定的参考依据, 还可以作为生前电击死与死后电击鉴别的辅助指标。

【关键词】法医病理学; 电击死; 骨骼肌; 肌肉细胞特异性泛素蛋白连接酶 1

【中图分类号】R89

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-10-29

Forensic medical research on expression of muscle-specific RING finger protein 1-mRNA in rats' skeletal muscle after electrocution

Yuan Zengqiong, Wan Lihua

(Teaching and Research Section of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study changing rules of skeletal muscle muscle-specific RING finger protein 1 (MuRF1)-mRNA at early stage after electrocution and its application in discriminating electrocution before death or after death. **Methods:** Sixty healthy Wistar rats were divided into three groups: electrocution group before death, electrocution group after death and blank control group, 20 rats in each group. Rats in electrocution group before death were electrocuted directly with 220 V alternating current; materials were drew at 0, 1, 3, 6 h after death. Rats in electrocution group after death were killed by cervical dislocation first and then were electrocuted, material were drew at 0, 1, 3, 6 h after electrocution. Rats in blank control group were put to death by cervical dislocation without electrocution; material were drew at 0, 1, 3, 6 h after death. Materials from gastrocnemius muscle and tibialis anterior were applied in detecting the level of MuRF1-mRNA with the technique of RT-PCR. **Results:** MuRF1-mRNA levels of rats' gastrocnemius muscle in electrocution group before death were increased significantly then were decreased at 1 h and 3 h after death, significantly different from those in blank control group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$) and lower than those in blank control group at 6 h after death ($P=0.925$). MuRF1-mRNA levels of tibialis anterior in electrocution group after electrocution were increased significantly, reaching the peak at 1 h after electrocution and were decreased at 3 h after electrocution, significantly different from those in control group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$). MuRF1-mRNA levels of gastrocnemius muscle and tibialis anterior in electrocution group after electrocution were increased compared with those in blank control group, but the increases were less obvious than those of electrocution group before death. MuRF1-mRNA levels of left hind leg were higher in tibialis anterior than in gastrocnemius muscle in both electrocution group before death and electrocution group after death. **Conclusions:** MuRF1-mRNA expressions are different in different skeletal muscles of the electrified rats. Expression differences can be used as index to estimate the electrocution time and to distinguish electrocution suffered before death or after death.

作者介绍:袁增琼, Email: 490404274@qq.com,

研究方向: 法医病理学、法医物证学。

通信作者:万立华, Email: ccfw@cqmu.edu.cn。

【Key words】forensic pathology; electrocution; skeletal muscle; muscle-specific RING finger protein 1

电击死和死后伪装电击的鉴别是法医实践中较难解决的问题之一,尤其是当皮肤无显著的电流斑、电击纹、金属化形成时。研究^[1-2]表明,电流可以引起血管、神经、心脏、骨骼肌的损伤及病理生理学改变。肢体骨骼肌常位于电流通路上,是机体遭受电流损伤较重的组织,电损伤可引发骨骼肌的强直性收缩,诱发细胞因子白介素-6(interleukin-6, IL-6)的大量释放。相关研究显示^[3],检测电损伤机体对称部位骨骼肌 IL-6 mRNA 含量变化,大致可以推断出电流是经过机体的哪一侧。肌肉细胞特异性泛素蛋白连接酶 1 (muscle-specific RING finger protein 1, MuRF1)^[4]在心肌和骨骼肌细胞核中特异表达,涉及肌肉应答和收缩调节的各个方面,过度表达后在骨骼肌 M 线处与粗肌丝连接蛋白结合,破坏粗丝联接蛋白的亚结构域,导致粗丝联接蛋白的降解。MuRF1 是蛋白质降解的相关基因,在失神经、制动、糖尿病等疾病的早期表达量升高,但并无电损伤应激状态下骨骼肌纤维蛋白的降解与 MuRF1 表达量变化相关的研究。骨骼肌由快、慢肌组成,快肌主要含 II 型肌纤维,II 型肌纤维氧化酶活性较低,糖酵解酶活性较高,可以在无氧条件下短时间内快速产生大量能量;慢肌主要含 I 型肌纤维,I 型肌纤维氧化酶活性较高,有氧氧化产生 ATP 能力强,但糖酵解酶活性较低。

本研究针对无电流斑形成的电击死亡案,在不能明确是生前电击死还是他杀死后伪装电击的情况下,研究通电肢体不同骨骼肌纤维在较短时间内 MuRF1-mRNA 的表达量,以期为生前电击死和死后电击的鉴别提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RNA 提取试剂盒(trizol)、RNA 反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒,均为 TaKaRa 产品,引物由上海生工合成。75%乙醇、异丙醇、三氯甲烷为重庆川东化工(集团)有限公司、DEPC 水(Beyotime 公司)。

1.2 实验动物

健康的 Wistar 大鼠 60 只,雌雄不限,体质量 180~220 g,由重庆医科大学动物中心提供。按完全随机分组(随机数字表)方法随机分为电击死组、死后电击组、空白对照组,每组 20 只。

1.3 方法

1.3.1 动物模型 电击死组:先将大鼠的右前肢与左后肢用磷酸盐缓冲液浸湿,再缠上磷酸盐缓冲液浸湿的纱布,将 220 V 交流电的两电极直接夹在纱布外层小腿内侧,通电 90 s 致死,于死后 0、1、3、6 h 4 个时间点各取 5 只大鼠取材。

死后电击组:将大鼠颈椎脱臼法处死后于 0、1、3、6 h 4 个时间点分别取 5 只大鼠,用磷酸盐缓冲液浸湿大鼠的右前肢与左后肢,再缠上磷酸盐缓冲液浸湿的纱布,将 220 v 交流电的两电极直接夹在纱布外层小腿内侧,通电 90 s 后立即取材。

空白对照组:将大鼠直接颈椎脱臼法处死后在 0、1、3、6 h 4 个时间点各取 5 只大鼠取材,不进行电击。

1.3.2 取材 取各组实验大鼠通电肢体腓肠肌、胫骨前肌 50 mg,置于冻存管中,放入液氮中速冻,后转移至-80℃冰箱中保存。

1.3.3 引物的设计与合成 PCR 引物的合成查阅 GenBank 数据库,用 primer 3.0 引物设计软件设计,由上海生工合成。管家基因 GAPDH 为内参,MuRF1 引物,上游 5'-GTCCAT-GTCTGGAGGTCGTT-3',下游 5'-GTCTTCGTTCCTTGCA-CA-3';GAPDH 上游 5'-CTTTGCTATCGTGAAGGACTC-3',下游 5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3'。

1.3.4 RT-PCR 检测骨骼肌中 MuRF1 的表达 提取左侧腓肠肌、胫骨前肌总 RNA,测量 RNA 的浓度,以 10 μl 体系进行逆转录反应,合成的 cDNA 储存于-20℃冰箱中待用。逆转录体系为 5 倍的缓冲液 2 μl,引物 0.5 μl,随机 6 核苷酸 0.5 μl,逆转录酶 0.5 μl,RNA 最多 500 ng,加不含 RNA 酶水至 10 μl,以 37℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃ 保存,循环 1 次。使用实时荧光定量 PCR 仪进行定量扩增,反应体系 10 μl,模板 cDNA 2.5 μl,引物 2.5 μl,酶 5 μl,设置反应条件 95℃ 10 s,95℃ 5 s,58℃ 15 s,72℃ 15 s,共循环 40 次。每个基因设 3 个复孔,取其循环阈值(Ct)均值,分别计算各组的 $\Delta Ct = Ct_{\text{MuRF1}} - Ct_{\text{GAPDH}}$,再计算 $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{空白对照组}}$, $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 为模板中目的基因的相对表达量。

1.4 统计分析

统计学处理应用 SPSS 17.0 软件,所得数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。不同死亡方式对 MuRF1-mRNA 表达水平的影响采用单因素方差分析法,实验组与对照组比较采用 Dunnett-t 检验,时间点两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧)。

2 结果

生前电击死左后肢腓肠肌 MuRF1-mRNA 表达量即刻升高为空白对照组的 2 倍,1、3 h 持续下降,但仍比空白对照组高,与空白对照组相比差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$),6 h 低于空白对照组($P=0.925$)(表 1、图 1)。生前电击死组左后肢胫骨前肌 MuRF1-mRNA 表达量即刻升高为空白对照组的 2.52 倍,1 h 达峰值,3 h 开始降低,与空白对照组相比差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$)(表 2、图 2)。死后电击组左后肢腓肠肌 MuRF1-mRNA 表达量较空白对照组轻微升高,0、1、3 h 与对照组相比差异无统计学意义($P=0.409$, $P=0.135$, $P=0.111$)(表 1、图 1)。死后电击组左后肢胫骨前肌 0、1、3 h MuRF1-mRNA 表达量升高与空白对照组相比差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$),6 h 较空白对照组轻微升高差异无统计学意义($P=0.266$)(表 2、图

2);电击死组、死后电击组大鼠左后肢胫骨前肌 MuRF1-mRNA 表达量在相同时间点均比腓肠肌高(表 1、2;图 1、2)。

表 1 不同时间左后肢腓肠肌 MuRF1-mRNA 的表达变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Relative expression of MuRF1-mRNA in gastrocnemius muscle of left hind leg at different time points ($\bar{x} \pm s$)

分组	0 h	1 h	3 h	6 h
电击死组	2.00 ± 0.27 ^a	1.36 ± 0.17 ^{ab}	1.20 ± 0.06 ^a	0.66 ± 0.05 ^b
死后电击组	1.13 ± 0.05	0.94 ± 0.06 ^b	0.82 ± 0.06 ^b	0.80 ± 0.03 ^a
空白对照组	1.00 ± 0.10	0.81 ± 0.07	0.74 ± 0.05	0.67 ± 0.03
F 值	51.560	33.952	92.646	22.511
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与空白对照组相比,差异有统计学意义;b,相邻 2 组时间点相比,差异有统计学意义

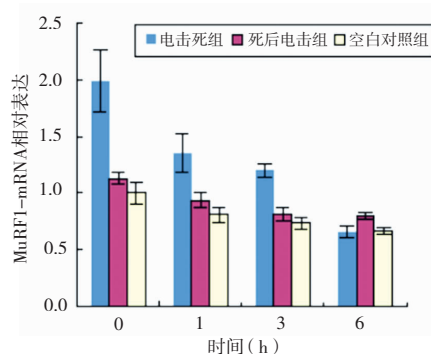


图 1 不同时间左后肢腓肠肌 MuRF1-mRNA 的相对表达量

Fig.1 Relative expression of MuRF1-mRNA in gastrocnemius muscle of left hind leg at different time points

表 2 不同时间左后肢胫骨前肌 MuRF1-mRNA 表达变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Relative expression of MuRF1-mRNA in tibialis anterior muscle of left hind leg at different time points ($\bar{x} \pm s$)

分组	0 h	1 h	3 h	6 h
电击死组	2.52 ± 0.04 ^a	4.52 ± 0.37 ^{ab}	4.19 ± 0.32 ^a	1.06 ± 0.04 ^{ab}
死后电击组	1.39 ± 0.03 ^a	2.58 ± 0.11 ^{ab}	2.27 ± 0.10 ^{ab}	1.45 ± 0.01 ^b
空白对照组	1.00 ± 0.16	1.61 ± 0.20	1.51 ± 0.15	1.40 ± 0.09
F 值	337.316	169.717	208.430	68.464
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与空白对照组相比,差异有统计学意义;b,相邻 2 组时间点相比,差异有统计学意义

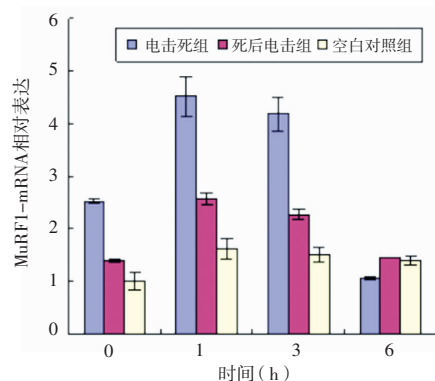


图 2 不同时间左后肢胫骨前肌 MuRF1-mRNA 的相对表达量

Fig.2 Relative expression of MuRF1-mRNA in tibialis anterior muscle of left hind leg at different time points

3 讨论

电击死和他杀伪装电击是法医学实践中常见的案件类型之一,但实际检案过程中,法医工作者对其诊断仍没有统一标准,尤其是对无电流斑情况的死因推断或特殊情况的水中电击。因此,许多学者从电击死后各个组织器官的形态学及分子水平进行了研究。研究^[4]表明,电流通过机体时骨骼肌会出现异常收缩带,肌小节长度显著缩短,肌小节 A 带、I 带结构特征消失,Z 线、M 线模糊,排列紊乱,间质中出现大小不一的致密颗粒。张付等^[5]通过免疫组化技术研究电击死后大鼠心、肝、脾、肺、肾、骨骼肌、皮肤、脑等脏器 c-fos 及 caspase-8 蛋白的表达情况,结果显示大鼠心、骨骼肌、肝、肺、肾、脑 c-fos 及 caspase-8 均显著升高,表明多器官参与了电流损坏的病理生理学过程。由于电击时电流通过心脏,心脏易受电流的损伤,马智华等^[6]利用基因芯片技术检测电击伤后早期心肌发生差异表达的基因,发现电击后心肌组织内大量基因发生了差异表达。潘守亭等^[7]用免疫组化技术深入的研究了生前电击伤、死后电击伤心肌组织组织蛋白酶抑制剂-1 随时间变化的规律。郝建文等^[8]更深入地研究了电击伤(死)、死后电击心肌组织 PEG-3 的表达情况,发现电击伤(死)左心室心肌 PEG-3 表达量增高。

免疫组化技术能很好地反映蛋白在细胞中的位置及其含量,但电击后有许多已转录的 mRNA 可能尚未及时的翻译成蛋白质,机体即已死亡,导致表达过程中断,使电击死与死后电击的鉴别仍存在一定难度。本实验建立无电流斑电击死模型,采用 real time-PCR 技术检测生前电击、死后电击骨骼肌 MuRF1-mRNA 的含量随死后时间的变化情况,结果显示生前电击、死后电击大鼠左后肢腓肠肌、胫骨前肌 MuRF1-mRNA 的含量随死亡时间的变化呈现一定的规律。腓肠肌即刻升高达峰值,而后持续降低;胫骨前肌即刻升高,1 h 达峰值,而后降低。对于这一结果,可能是骨骼肌在电损伤发生强直性收缩时,由于肌细胞释放大量的细胞因子 IL-6,通过细胞因子途径激活 MuRF1 表达,MuRF1 的过多表达参与骨骼肌收缩应答,降解骨骼肌粗肌丝连接蛋白、肌球蛋白等。

骨骼肌在机体临床死亡后一段时间内仍具有一定的生物活性,在此阶段对外界刺激仍有一定的反应^[12],本实验观察到死后不同时间骨骼肌对电损

伤的收缩反应,王慧君和武忠弼^[13]也证实骨骼肌超声反应时期对电损伤的收缩反应。有关研究^[14]证实,在死后短时间内骨骼肌受到外界刺激时,除了肉眼可见的应答外,分子水平也在发生变化。本实验结果显示,死后电击左后肢腓肠肌、胫骨前肌MuRF1-mRNA 的含量均比空白对照组高,但随死后时间的延长,骨骼肌 MuRF1-mRNA 的含量开始下降,6 h MuRF1-mRNA 的含量与空白对照组相比无显著差异,这说明随着死后时间的延长骨骼肌细胞的生物活性降低,骨骼肌受电刺激后 MuRF1-mRNA 的表达变弱。生前电击大鼠时,检测到左后肢骨骼肌 MuRF1-mRNA 的含量即刻升高,后降低,说明骨骼肌在受电刺激收缩的同时可以在短时间内激活 MuRF1 基因的表达,随着死亡时间的延长,MuRF1-mRNA 降解,其含量降低。但生前电击死组左后肢腓肠肌、胫骨前肌 MuRF1-mRNA 含量均比死后电击组、空白对照组高,可以辅助鉴别生前电击死、死后电击。

骨骼肌含有不同类型的肌纤维,对电刺激的反应也不相同。本实验结果显示,腓肠肌受电刺激后 MuRF1-mRNA 的含量即刻升高,随后降低;胫骨前肌即刻升高,1 h 达峰值,3 h 开始下降,死后相同时间点胫骨前肌 MuRF1-mRNA 的含量较腓肠肌高。推测这可能是因为胫骨前肌主要含 II 型肌纤维,II 型肌纤维的糖酵解酶活性较高,可以在无氧条件下短时间内快速产生大量能量,胫骨前肌受电损伤后在无氧条件下可以快速产生 ATP,而泛素蛋白酶体途径又是 ATP 依赖的蛋白酶降解途径,胫骨前肌可以获得大量的 ATP,表达更多的 MuRF1-mRNA。Hiscock 等^[15]也研究发现骨骼肌收缩引起 II 型肌纤维的 IL-6 mRNA 表达量显著升高,分析原因为 II 型肌纤维肌浆网较 I 型肌纤维发达,II 型肌纤维能够释放更多的钙离子,钙离子的增多诱导 IL-6 的高表达。说明 II 型肌纤维可以产生更多的 IL-6,从而也可诱导更多 MuRF1-mRNA 的表达。所以电损伤时胫骨前肌比腓肠肌反应更灵敏,产生更多的 MuRF1-mRNA。

综上所述,当电击案件中无电流斑形成,组织学改变不明显时,MuRF1 可为电击死后早期死亡时

间的推断提供一定的参考依据,并可作为生前电击死与他杀死后伪装电击鉴别的辅助指标之一。

参 考 文 献

- [1] 秦志强,龚毓昌,黄晓华.电击伤组织的超微结构观察[J].法医学杂志,2001,17(3):142-144.
- [2] 董利,陈玉川,胡丙杰.电流损伤的病理生理学及发生机制研究的新进展[J].法医学杂志,2002,18(1):52-59.
- [3] 王晔,陈国俊,刘敏,等.无电流斑电击死兔骨骼肌 IL-6mRNA 表达研究[J].中国法医学志,2008,23(6):376-379.
- [4] McElhinny AS,Kakinuma K,Sorimachi H,et al.Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1[J].The Journal of Cell Biology,2002,157(1):125-136.
- [5] 张付,王晔,杨静,等.大鼠电流损伤 c-fos 与 caspase-8 表达的实验研究[J].华西医学,2006,21(2):310-312.
- [6] 马智华,万立华,曼珩,等.利用基因芯片技术研究电击伤后心肌组织基因表达谱的改变[J].第三军医大学学报,2005,27(15):1561-1563.
- [7] 潘守亭,万立华,步建平,等.电击伤后大鼠心肌 TIMP-1 表达的实验研究[J].中国法医学杂志,2008,23(1):20-22.
- [8] 郝建文,万立华,李万军.大鼠电流损伤后心肌 PEG-3 表达的法医学研究[J].重庆医科大学学报,2008,33(8):947-950.
- [9] Caron AZ,Drouin G,Desrosiers J,et al.A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse[J].J Appl Physiol,2006,106(6):2049-2059.
- [10] Libermann TA,Baltimore D.Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- κ B transcription factor[J].Mol Cell Biol,1990,10(5):2327-2334.
- [11] Shimizu H,Mitomo K,Watanabe T,et al.Involvement of a NF- κ B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines[J].Mol Cell Biol,1990,10(2):561-568.
- [12] 祝家镇.法医病理学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,1999:34.
- [13] 王慧君,武忠弼.超生反应阶段人骨骼肌对电刺激反应的形态学研究[J].中国法医学杂志,1998,13(1):1-5.
- [14] van Hees HW,Schellekens WJ,Linkels M,et al.Plasma from septic shock patients induces loss of muscle protein[J].Critical Care,2011,15(5):R233.
- [15] Hiscock N,Chan MH,Bisucci T,et al.Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction:evidence of fiber type specificity[J].FASEB J,2004,18(9):992-994.

(责任编辑:冉明会)