

# 大鼠溺死后肺组织与血清 IL-1β、IL-13mRNA 表达变化

姜美玲<sup>1</sup>, 郭文平<sup>2</sup>, 赵晋芳<sup>3</sup>, 芦俊峰<sup>1</sup>, 梅 泽<sup>1</sup>, 刘佳佳<sup>1</sup>, 梁新华<sup>1</sup>

(1. 山西医科大学法医学院, 山西 太原 030001; 2. 晋中市公安局城区分局, 山西 晋中 030600;  
3. 山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001)

**【摘要】目的** 检测大鼠肺组织和血清中 IL-1β、IL-13mRNA 表达变化, 探讨 IL-1β、IL-13mRNA 的变化情况与溺死的关系。**方法** 12 只 SD 大鼠随机分为对照组、溺死组(实验组)。分别提取各组大鼠右侧肺下叶及右心室血清, 应用 TaqMan 探针法检测肺组织及右心室血清 IL-1β、IL-13mRNA 的表达情况。**结果** (1) 溺死组大鼠肉眼观察: 体表征象及解剖所见符合生前溺死特征。(2) 肺组织中 IL-1β、IL-13mRNA 表达检测: 与对照组比较, 实验组 IL-1β、IL-13 表达呈下降趋势, 差异无统计学意义 ( $p > 0.05$ )。(3) 血清中 IL-1β、IL-13mRNA 表达检测: 与对照组比较, 实验组 IL-1β 表达显著升高 ( $p < 0.01$ )、IL-13 表达显著升高 ( $p < 0.01$ )。**结论** (1) IL-1β、IL-13 mRNA 在溺死组肺组织中表达呈下降趋势, 可能是大鼠溺死出现代偿性抗炎反应综合症导致免疫无能的表现。(2) IL-1β、IL-13 mRNA 在血清中表达明显升高, 可能与溺水应激及溺死后急性肺损伤创伤应激有关。

**【关键词】** 法医病理学; 溺死; TaqMan 探针法; 细胞因子; IL-1β; IL-13

**【中图分类号】** DF795.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-5728 (2017) 02-0137-04

doi: 10.13618/j.issn.1001-5728.2017.02.006

**The changes on expression of IL-1β and IL-13 mRNA in lung tissue and serum after drowning rats** (Jiang Meiling<sup>1</sup>, Guo Wenping<sup>2</sup>, Zhao Jinfang<sup>3</sup>, Lu Junfeng<sup>1</sup>, Mei Ze<sup>1</sup>, Liu Jiajia<sup>1</sup>, Liang Xinhua<sup>1</sup>/1. Department of Forensic Pathology Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Jinzhong city, Shanxi Province police station of city branch, Shanxi 030600, China; 3. Department of Public Health Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

**【Abstract】Objective** To observe the change in IL-1β, IL-13mRNA expression in drowning rat lungs and serum, so as to investigate the significance of IL-1β and IL-13 mechanism in the development of drowning. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, drowning group. Then using TaqMan probe method to determine the expression of IL-1β and IL-13 mRNA in Right lower lobe of lung tissue and the serum of right ventricle, which were extracted respectively from each group of rats. **Results** (1) The lung tissue morphological changes: Typical appearance signs and anatomy of drowning group meet ante-mortem drowning feature. (2) The expression of IL-1β, IL-13 in lung tissue: compared with the control group, the expression of IL-1β and IL-13 were slightly decreased, which has no statistical significance. (3) The expression of IL-1β and IL-13 in serum: compared with the control group, the expression of IL-1β and IL-13 were significant increased, both of which has statistical significance. **Conclusion** (1) The expression of IL-1β and IL-13 were decreased in lung tissue may be due to drowned rats present compensatory anti-inflammatory response syndrome which causes immune incompetent performance. (2) The expression of IL-1β and IL-13 were significant increased in serum may be relate to drown stress and drowning associated acute lung injury after traumatic stress.

**【Key words】** forensic pathology; drowning; TaqMan probe method; cytokine; IL-1β; IL-13

在法医学实践中, 水中尸体的死因判定是世界法医学者公认的难题之一, 其鉴定的关键是判断生

前溺死还是死后抛尸, 而诊断和发生机制等方面仍存在许多问题。目前, 国内外对溺死诊断方法主要靠尸体解剖和硅藻检验等综合分析, 而尸体解剖征象缺乏特异性, 且在高度腐败尸体中常消失或受外界因素干扰, 给法医学鉴定带来难度; 硅藻检验虽发展较久, 应用广泛, 但国内外很多学者存有疑义<sup>[1]</sup>。本文通过制作大鼠溺死模型, 采用一步法实时荧光

**【基金项目】** 山西省自然科学基金资助项目 (2011011041-3)  
**【作者简介】** 姜美玲, 女, 硕士研究生, 研究方向: 法医病理学。  
E-mail: 362168949@qq.com  
**【通信作者】** 梁新华, 男, 副教授, 硕士, 主要从事法医病理学与法医临床学教学与科研工作。E-mail: liangxh163.com

定量 PCR 方法, 以 ACTB mRNA 作为内参基因, 检测大鼠肺组织及血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 的表达变化, 探究其作为溺死诊断指标的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物分组及模型制作

实验动物分组 健康雄性 SD 大鼠 12 只, 由山西医科大学动物中心提供, 质量 150~200g, 随机分为溺死组与对照组, 每组 6 只。

模型制作及检材提取 大鼠均笼养, 室温保持在 20~25 $^{\circ}$ C。各组处理如下: 溺死组大鼠投入水桶中, 让其自由游泳至 4h, 再进行溺死。对照组采用颈椎脱臼法处死。解剖大鼠, 抽取右心室心血 2~4mL,

放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱冷却 30min, 10 000rpm 离心 3min, 收集血清, 贮存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。取血后, 剪取右侧肺下叶, 贮存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

### 1.2 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 的提取

肺组织 mRNA 的提取按照 BIOG RNA Tissue Kit 的说明进行操作, 血清 mRNA 的提取参照 BIOG cfRNA Easy Kit 的标准操作说明进行。

### 1.3 引物、探针设计与合成

目的基因及内参基因引物、探针序列均来自于 GeneBank, 并采用 AlleleID6.0 软件进行引物设计优化, 经 BLAST 检索确认特异性, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物、探针序列见表 1。

表 1 引物及探针序列

Table 1 Primers and probe sequence

基因名称	引物序列	产物长度 (bp)
IL-1 $\beta$	F5' — ACGGGTTCCATGGTGAAGT — 3'	79
	R 5' — CCTCTCAAGCAGAGCACAGA — 3'	
	P5' — ACTATGTCCCGACCATTGCTGTTTCC — 3'	
IL-13	F 5' — GGTCCACAGCTGAGATGTCC — 3'	77
	R5' — CTGCTCAATTACTCCAAGCAACT — 3'	
	P5' — TCTCCCCTCAGTGGCCATAGCGGAA — 3'	
ACTB	F5' — CCTCTATGCCAACACAGTGC — 3'	92
	R5' — AGGAGCCAGGGCAGTAATCT — 3'	
	P5' — CCACCATGTACCCAGGCATTGCTGAC — 3'	

### 1.4 一步法实时荧光定量 PCR

在 Roche LightCycler 480 Real-Time PCR 仪上采用 Taqman 探针法进行 PCR 扩增。按照一步法实时荧光定量试剂盒 (BIOGHSC Super Probe One Step Kit) 说明进行操作, PCR 扩增总体积 20 $\mu$ L, 内含 2x BIOGHSC Super Probe Mix 10 $\mu$ L, BIOGHSC Super Enzyme Mix 0.3 $\mu$ L, RT-PCR Enhancer 0.25 $\mu$ L, 上下游引物 (10 $\mu$ M/L) 各 0.6 $\mu$ L, TaqMan Probe (10 $\mu$ M/L) 0.5 $\mu$ L, 模板 RNA 10ng~1 $\mu$ g, RNase free ddH<sub>2</sub>O 加至 20 $\mu$ L。样品管和内参管均为三复管实验。PCR 热循环参数: 反转录 42 $^{\circ}$ C 15min; 预变性 95 $^{\circ}$ C 10min; 变性 95 $^{\circ}$ C 15s; 退火 60 $^{\circ}$ C 30s, 40 个循环。反应结束后, 电脑自动分析荧光信号并将其转换 CT 值。结果采用 2<sup>- $\Delta\Delta$</sup> Ct 法计算 mRNA 的相对表达量。

### 1.5 统计学方法

应用 SPSS23.0 软件包进行结果的统计分析, 所有数据均以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组样本之间均数的比较采用 t 检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 死后征象及解剖所见

溺死组大鼠在溺死终末期均未见口鼻部流出泡沫, 大鼠肺组织色泽光亮、大部分呈苍白色, 存在广泛出血点, 部分融合成片, 挤压肺组织可见气管和肺切面有泡沫样液体流出。对照组大鼠肺组织色泽柔和, 呈淡粉色, 可见散在出血点。

### 2.2 肺组织 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 表达检测

与对照组比较, 溺死组大鼠肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 表达呈下降趋势, 差异均未见统计学意义 ( $P > 0.05$ )。具体结果见表 2, 基因相对表达差异见图 1。溺死组中 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 的表达肺组织中显著高于血清 ( $P < 0.01$ ), 具体结果见图 2。

### 2.3 右心室血清 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 表达检测

与对照组比较, 溺死组大鼠右心室血清 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 表达均显著升高 ( $P < 0.01$ )。具体结果见表 3, 基因相对表达差异见图 3。

表2 大鼠肺组织 IL-1β、IL-13 mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The expression of IL-1β、IL-13 mRNA of rat lung tissue ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	组别	例数	( $\bar{x} \pm s$ )	t 值	P 值
IL-1β	对照组肺组织	6	22.93±1.30	-1.608	0.14
	溺死组肺组织	6	21.96±0.72		
IL-13	对照组肺组织	6	23.32±1.32	-1.601	0.14
	溺死组肺组织	6	22.33±0.73		

表3 大鼠血清 IL-1β、IL-13 mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 The expression of IL-1β、IL-13mRNA of rat serum ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	组别	例数	( $\bar{x} \pm s$ )	t 值	P 值
IL-1β	对照组血清	6	31.52±1.12	-4.73	0.001
	溺死组血清	6	29.34±0.65		
IL-13	对照组血清	6	31.96±1.24	-4.50	0.001
	溺死组血清	6	29.13±0.70		

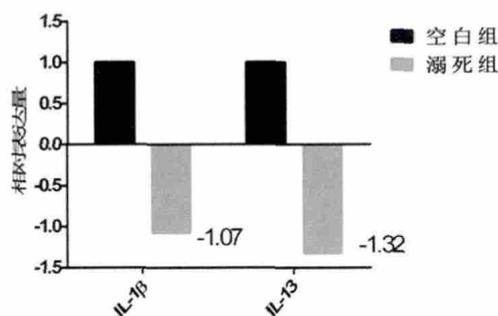


图1 大鼠肺组织 IL-1β、IL-13mRNA 表达

Fig.1 The expression levels of IL-1β、IL-13 mRNA of rat lung tissue

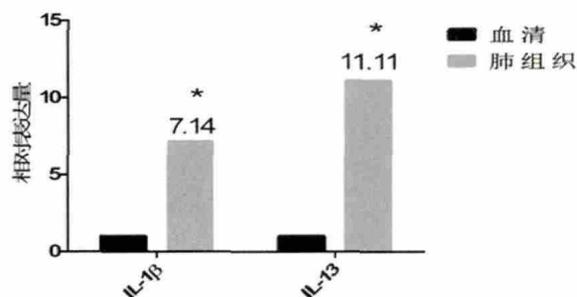


图2 大鼠溺死组肺组织与血清 IL-1β、IL-13 mRNA 的表达的比较

Fig.2 The expression levels of IL-1β、IL-13 mRNA of rat lung tissue and serum

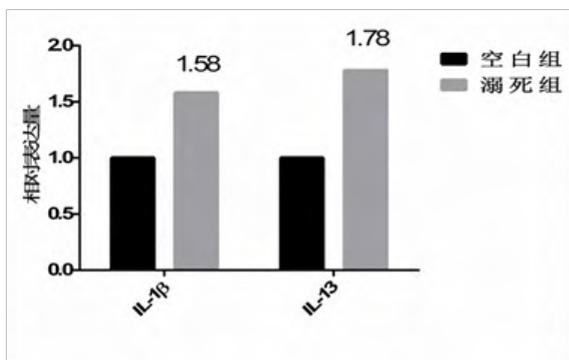


图3 大鼠血清 IL-1β、IL-13mRNA 表达

Fig.3 The expression levels of IL-1β、IL-13 mRNA of rat serum

### 3 讨论

溺死的病理生理取决于多方面因素，其中肺损伤是目前研究的热点之一，溺水可导致急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 或急性呼吸窘迫综合症 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)。大量实验研究表明，炎症性细胞因子已成为 ALI/ARDS 的一个重要发病机制，但具体的形成机制尚不十分明确<sup>[2]</sup>，且在溺死引起的肺损伤中涉及细胞因子的研究甚少。

IL-1β 在炎症反应中充当着“门卫”的作用，主要由单核巨噬细胞分泌和释放，属于促炎细胞因子。溺水引起急性肺损伤相关研究表明 IL-1β 参与白细胞与内皮细胞间相互作用，促进多形核白细胞 (polymorphonuclear, PMN) 的聚集、黏附，诱导破骨细胞、成纤维细胞等释放胶原酶分解胶原蛋白，加重肺血管内皮细胞 (pulmonary vascular endothelial

cells, PVEC) 损伤, 内皮细胞完整性破坏, 形成病理通道, 导致水和大分子成分外渗, 形成肺水肿<sup>[3]</sup>。IL-13 是抗炎细胞因子中的一重要成分, 主要由 Th2 型 T 辅助淋巴细胞、肥大细胞和 B 细胞产生, 可抑制单核巨噬细胞促炎性细胞因子的产生, 促进白介素-1 受体拮抗剂 (IL-1ra) 的合成等, 进而间接抑制 IL-1 的功能, 是一种多效应 CKs<sup>[4]</sup>。但在溺死相关文献中, 有关 IL-13 的研究较少。

本研究通过实时荧光定量 PCR 检测发现, 实验组大鼠血清的 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 水平与对照组比较, 表达均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 实验组大鼠肺组织的 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 表达呈下降趋势, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 且溺死组中 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 水平肺组织明显高于血清, 这与相关研究是一致的, 张青<sup>[5]</sup>发现 ARDS 患者血清中 IL-13 水平显著高于健康对照组, William 认为支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 IL-1 $\beta$  水平无显著变化<sup>[6]</sup>, 冯志成等<sup>[7]</sup>研究认为 ARDS 患者 BALF 中 IL-1 $\beta$  水平明显高于血清水平。Takako Miyazato 认为水的吸入会导致严重的肺损伤, 包括激活早期炎症因子, 如 IL-1 $\beta$  mRNA 在溺死尸体肺组织中的表达较因机械性窒息死亡的肺组织明显升高<sup>[8]</sup>。这说明 IL-1 $\beta$ 、IL-13 参与了 ALI/ARDS 的发病过程, 可能由于纳入患者的病因不同或所处时期不同而致检测结果不一致。

本实验发现肺组织 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 表达呈下降趋势, 可能与溺水后大鼠发生 ALI 过程中出现代偿性抗炎反应综合征 (CARS) 导致免疫无能的结果<sup>[9]</sup>。而血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 表达明显上调可能与溺水应激有关, 监测血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-13 mRNA 的表达变化, 可能对溺死的诊断有一定的帮助。

本实验利用动物模型复制溺水过程, 通过

TaqMan 探针法检测到大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-13 水平明显高于对照组, 提示 IL-1 $\beta$ 、IL-13 可能参与了溺死的发生、发展, 从而为水中尸体的死因鉴定提供依据。

#### 参 考 文 献

- [1] 杜宇. 淡水硅藻种群及数量变化的影响因素及其法医学意义 [J]. 中国法医学杂志, 2014, 9(4):346-348.
- [2] Andreasschwingshackli, Dai Kimura, Cynthia R R, et al. Regulation of inflammatory biomarkers by intravenous methylprednisolone in pediatric ARDS patients: Results from a double-blind, placebo-controlled randomized pilot trial [J]. Cytokine, 2016, 77:63-71.
- [3] Dmitryn G, Dilyyara I C, Suamn C, et al. Identification of new biomarkers for Acute Respiratory Distress Syndrome by expression-based genome-wide association study [J]. BMC Pulmonary Medicine, 2015, 5(1): 95.
- [4] 王海燕. 细胞因子和炎症介质在急性呼吸窘迫综合征发病机制中的作用 [J]. 中华肺部疾病杂志 (电子版), 2014, (06): 699-702.
- [5] 张青, 李琦, 毛宝龄, 等. 急性呼吸窘迫综合征患者血浆 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 和 IL-13 水平变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 21(12):2479-2480.
- [6] Park WY, Goodman RB, Steinberg K P, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome [J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2001, 64(10): 1896-1903.
- [7] 冯志成. 血清及支气管肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 在急性呼吸窘迫综合征中的变化及意义 [J]. 现代预防医学, 2011, 38(18): 3804-3805.
- [8] Tkako M, Takali I, Tomomi M, et al. Molecular pathology of pulmonary surfactants and cytokines in drowning compared with other asphyxiation and fatal hypothermia [J]. Legal Med, 2012, 126:581-587.
- [9] 熊玉宝. MIP2 在大鼠急性胰腺炎肺损伤发病机制中的作用 [D]. 苏州: 苏州大学, 2004.

(收稿日期: 2016-03-29)

## 2016 年全国查处司法鉴定违法违规问题 230 多件

在司法鉴定领域中, 一些违法违规问题时有发生, 比如违反鉴定程序规则和技术操作规范、超出登记业务范围开展鉴定活动, 组织未取得执业资格的人员从事司法鉴定业务。仅 2016 年, 全国查处司法鉴定违法违规问题 230 多件, 注销 132 家鉴定机构, 因资质不符合要求、相关考试不合格等原因注销上千鉴定人, 有力规范了执业秩序, 提升了行业整体的能力水平, 但这也从侧面反映出当前司法鉴定机构和鉴定人准入门槛存在的问题。当前, 司法鉴定的行业管理还有些粗放, 司法行政管理要更为精细化, 司法行政部门要进一步严格司法鉴定人、鉴定机构的准入门槛, 加强专业人员的培训, 通过一系列举措促进司法鉴定的公正。