

免疫组化及特殊染色技术在早期心肌缺血死后诊断中的应用

陈忠婕 杜宇

中国刑事警察学院

DOI:10.32629/ffcr.v4i2.19971

[摘要] 急性心肌梗死(AMI)作为心源性猝死的主要诱因之一,其全球发病态势呈现逐年递增趋势。鉴于由早期心肌缺血(EMI)引发的急性心梗常缺乏典型病理特征,如何实现早期心肌缺血的快速精准识别已成为法医学领域的研究焦点。多年来,国内外学者致力于探寻高敏感度、高特异性的早期心肌缺血诊断方法与指标。其中,免疫组织化学(IHC)及特殊染色技术凭借其显著的组织特异性、高检测灵敏度以及良好的实用价值,被广泛应用于早期心肌缺血的法医学鉴定。本文旨在系统综述免疫组化及特殊染色技术在早期心肌缺血死后诊断中的应用价值,并对其未来发展前景进行展望。

[关键词] 免疫组织化学; 特殊染色; 早期心肌缺血; 综述

中图分类号: R392 文献标识码: A

Application of Immunohistochemistry and Special Staining Techniques in Postmortem Diagnosis of Early Myocardial Ischemia

Zhongjie Chen Yu Du

China Criminal Police College

[Abstract] Acute myocardial infarction (AMI), as one of the main causes of sudden cardiac death, shows a year-by-year increasing trend in global incidence. Considering that acute myocardial infarction caused by early myocardial ischemia (EMI) often lacks typical pathological features, achieving rapid and accurate identification of early myocardial ischemia has become a research focus in the field of forensic medicine. Over the years, scholars at home and abroad have been dedicated to exploring highly sensitive and specific methods and indicators for the diagnosis of early myocardial ischemia. Among these, immunohistochemistry (IHC) and special staining techniques, owing to their significant tissue specificity, high detection sensitivity, and practical value, have been widely applied in the forensic identification of early myocardial ischemia. This article aims to systematically review the application value of immunohistochemistry and special staining techniques in postmortem diagnosis of early myocardial ischemia and to discuss prospects for their future development.

[Key words] immunohistochemistry; special staining; early myocardial ischemia; review

在法医学领域,早期心肌缺血(EMI)相关猝死案例屡见不鲜,多数患者在缺血发作后6小时内死亡。尽管传统尸检可发现冠状动脉粥样硬化病变,但由缺血导致的微细病理学改变往往难以检出,这构成了法医学鉴定的主要障碍。然而,随着检测技术的持续发展,通过深化研究与技术革新,这些微观病理变化有望被准确识别。

多年来,HE染色、特殊染色技术、免疫组织化学、超微结构分析及死后影像学等多种诊断方法的不断革新,极大拓展了早期心肌缺血死后诊断的技术路径与精度。其中,免疫组化与特殊染色凭借其高度特异性、良好敏感度及操作便捷性等特性,已成为早期心肌缺血法医学诊断的重要辅助工具。本文综述了这两种技术在早期心肌缺血死后鉴定中的应用进展与临床价值,以

期为法医实际工作提供更为科学的实践指导依据。

1 免疫组化诊断指标的应用

1.1 心肌细胞内固有蛋白

1.1.1 心型脂肪酸结合蛋白(heart-type fatty acid binding protein, H-FABP)。心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)作为心脏特异性标志物,对心肌缺血早期诊断具有重要临床意义。鉴于其迅速释放入血的特性,该蛋白被视为急性心肌梗死(AMI)诊断的理想生物标志物之一。此外,由于其高表达水平及组织特异性,H-FABP在法医学领域亦具有广泛应用前景。

明娟^[1]等通过免疫组化技术在大鼠AMI模型中证实,心肌缺血发生15分钟即可在心内膜下及乳头肌区域观察到H-FABP的散在或小灶性缺失,且随着缺血时间延长,缺失范围呈渐进性扩大

趋势。类似地,在心肌梗死尸检心脏标本中亦观察到H-FABP表达显著缺失^[2]。郭森^[3]等则系统考察了H-FABP作为诊断指标的稳定性,实验表明将缺血心肌组织于4℃条件下保存时,H-FABP在心肌细胞内的脱失面积随时间推移逐渐增大,同时其阳性表达强度呈下降趋势。

1.1.2肌钙蛋白(cardiac troponin, cTn)。肌钙蛋白(cTn)是诊断早期心肌缺血的“金标准”,因其高敏感性和高特异性而被广泛应用于法医学实践工作中。该蛋白复合物由肌钙蛋白C(cTnC)、肌钙蛋白T(cTnT)及肌钙蛋白I(cTnI)三种亚单位组成,这些结构各异的亚单位协同作用以维持心肌收缩系统的稳定性。

贾建长^[4]等通过构建家兔急性心肌缺血模型,发现缺血仅持续0.5小时后,心肌细胞内cTnI即出现分布异常,表现为明显向细胞膜周边聚集的现象,且随缺血时间延长,其分布模式逐渐紊乱并呈现特征性缺血模式。同样地,对AMI患者心肌组织的免疫组化分析也揭示了相似的cTnI分布异常特征^[5]。刘重元^[6]等通过对心脏标本的观察,发现AMI及EMI患者心肌细胞内cTnT均呈现明显缺血现象,这一发现不仅证实了cTnT和cTnI在心肌缺血过程中的表达变化规律,也为EMI的死后诊断提供了新的生物学标志物。

1.2黏附和进入心肌细胞内的血浆成分

血浆中的某些特定蛋白组分,诸如补体、纤维连接蛋白(Fn)以及纤维蛋白原(Fg)等,在心肌细胞膜受损破裂时,能够透过受损的毛细血管进入组织间隙,进而向心肌细胞内扩散。这种现象的发生,为法医学实践中的EMI死后诊断提供了新的视角和检测依据。通过检测这些蛋白组分的存在与否,我们能够更为准确地对EMI进行诊断。

申成斌^[7]等通过免疫组化方法深入探索了大鼠心肌缺血后的蛋白反应,发现心肌缺血仅15分钟后,Fg和补体成分C5即呈现出阳性反应;而30分钟后,Fn也开始呈阳性。胡丙杰^[8]等的研究进一步证实了这些蛋白在死后样本中的持久性:Fg在4℃下可稳定存在于死后7天的尸体中,C5的阳性反应则可延续至死后14天,Fn的稳定性尤为出色,其阳性反应可延续至死后28天。这三项指标均展现出了对自溶作用的良好耐受性,为法医病理学提供了有力的诊断依据。

1.3缺血心肌细胞诱导表达成分

1.3.1缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)。缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)作为机体应对缺氧环境的核心调控分子,能够介导多个下游基因的表达变化,使机体在低氧条件下维持稳态平衡。其不仅在机体缺氧应答的初始阶段即发挥关键作用^[9],还可通过与低氧反应元件(HRE)的特异性结合^[10],精确调控一系列缺氧响应基因的转录过程。

李志刚^[11]等研究表明,在大鼠AMI模型中,术后30分钟即可检测到缺血心肌HIF-1 α mRNA表达上调,且该表达水平随时间推移逐渐增强,在4~6小时达到峰值。同年,另一项针对AMI患者心肌组织的研究同样观察到心肌细胞中存在显著HIF-1 α 阳性表达^[12]。杜中波^[13]等通过综合运用免疫组化、免疫荧光及

Western Blot等技术,在动物模型中发现大鼠心内膜下心肌在缺血15分钟后即可检测到微弱HIF-1 α 阳性表达,3小时后达到高峰,这一结果提示HIF-1 α 可作为早期心肌缺血引发心源性猝死的重要敏感指标。

1.3.2血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。作为关键的血管生成调节因子,血管内皮生长因子(VEGF)在心肌缺血条件下能够诱导新生血管形成,进而促进心肌组织的修复过程。VEGF的表达受缺氧环境调控,这使其成为缺血性疾病治疗研究的重要靶点。

Xu^[14]等运用免疫组化SABC法证实,心肌缺血仅30分钟即可在组织中检测到VEGF的阳性表达,揭示了其在缺血早期的快速响应机制。毛瑞明^[15]等采用高灵敏度EliVision免疫组化技术发现,大鼠心肌缺血15分钟后即于心内膜下出现VEGF弱阳性表达,且随缺血时间延长,其表达强度与范围均呈现递增趋势。这一发现不仅再次印证了VEGF在心肌缺血早期阶段的关键作用,更为其在法医鉴定中的应用提供了实验依据。

1.3.3内皮素(endothelin, ET)。内皮素(ET)作为一种具有显著生物学活性的长效血管收缩肽,不仅是心血管功能调节的关键介质,还在维持基础血管张力及心血管系统内环境稳态方面发挥核心作用。现有研究表明,ET在急性心肌缺血及缺血再灌注损伤病理过程中发挥重要作用。

王志勇^[16]等通过实验发现,大鼠心肌缺血60分钟后可见部分心肌细胞ET表达阳性,且随缺血时间延长表达增强;当慢性缺血状态突然加重时,仅15分钟即可观察到显著ET阳性表达。马孟云^[17]等采用RT-PCR技术从分子层面证实缺血可诱导ET-1 mRNA表达上调,为后续免疫组化研究提供了重要的分子生物学依据。

1.3.4转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)。转化生长因子 β 1(TGF- β 1)作为关键细胞因子,通过调节细胞增殖、分化及凋亡等生命活动,对组织生长与再生修复过程发挥重要调控作用。其在细胞信号转导网络中展现出多重生物学功能,既可调控蛋白质合成与分泌,又能影响胞外基质动态平衡。在心肌梗死后的瘢痕形成过程中,TGF- β 1具有显著的促进组织修复作用^[18]。

袁翔天^[19]等的研究证实,急性及复发性心肌梗死患者心肌组织中TGF- β 1的表达水平显著高于正常对照组,其表达变化与纤维母细胞活化蛋白 α (FAP α)检测相结合,可作为急性心肌缺血性猝死的重要诊断标志物。该发现为心肌缺血性疾病的临床诊断与治疗提供了新的理论依据,有助于更精准评估患者风险与预后,并指导及时干预策略的制定。

2 组织化学特殊染色的应用

组织化学特殊染色技术作为EMI死后诊断中的重要辅助手段,其应用原理主要基于缺血心肌与正常心肌组织对特定色素的亲合力差异^[20]。传统染色方法体系涵盖HBFP染色、亮绿染色技术、酸性复红光绿染色法、改良的Gomori氏染色法以及PTAH染色等多种技术手段。

刘英坤^[21]等的研究成果证实,Heidenhain染色法在EMI诊断

中展现出卓越的准确性,能够特异性地将AMI患者的缺血心肌组织染成黑色,其染色效果显著优于传统染色方法。胡志红^[22]等通过构建动物模型实验进一步发现,Heidenhain染色法在动物实验中表现出较高的敏感性。上述研究证据共同表明,Heidenhain染色法在EMI诊断领域具有广阔的临床应用价值,可为病理学诊断提供精准可靠的客观依据。

3 讨论

免疫组化及特殊染色技术在EMI的法医学鉴定中已得到普遍应用,并逐步发展为关键的辅助技术,但目前仍存在若干局限性。一方面,多数特殊染色技术的反应机制尚未被充分阐明,染色剂与组织成分间的相互作用可能涉及多种理化特性,这种机制的不明确性制约了技术的推广应用与优化发展^[23]。另一方面,免疫组化染色过程中常见的抗原抗体非特异性结合、抗原决定簇降解等状况均可能导致结果偏差,从而产生假阴性或假阳性现象^[23]。因此,在实际应用中必须严格把控技术环节的各项变量,以确保诊断结论的科学性与可靠性。

随着组织病理学技术的持续革新,具备稳定染色效果和高效工作流程的全自动免疫组化及特殊染色设备在日常检验工作中扮演着愈发重要的角色。为了进一步提高诊断的准确性和精密密度,建议在此基础上采用多指标联合、人工智能和优化的统计方法。此外,结合蛋白质组学、分子生物学、光谱学及质谱成像等前沿技术手段^[24],亦能显著增强全自动染色技术在EMI法医学鉴定中的应用价值。

通过多维技术手段的有机结合,可实现组织样本信息的精准获取与深度解析,为病理学诊断提供更为全面可靠的科学依据。未来发展中,应持续探索创新技术并推动其在法医病理学检验实践中的应用。

[参考文献]

- [1]明媚,孟祥志.大鼠心脏型脂肪酸结合蛋白在早期心肌梗血时的含量变化[J].中国法医学杂志,2004,(02):68-71.
- [2]明媚,孟祥志.早期心肌梗血心脏型脂肪酸结合蛋白的免疫组织化学观察[J].法医学杂志,2004,(01):15-17+71.
- [3]郭森.心肌脂肪酸结合蛋白在诊断早期心肌梗死的死后稳定性研究[J].重庆医科大学学报,2008,33(12):1488-1491.
- [4]贾建长,赵子琴,顾云菊,等.家兔急性心肌梗死cTnI免疫组织化学实验研究[J].法医学杂志,2005,(02):104-106+173.
- [5]贾建长,赵子琴,顾云菊,等.人体冠心病心肌组织cTnI免疫组织化学研究[J].法医学杂志,2007,(03):185-187+242.
- [6]刘重元,张志伟,周新林.早期心肌缺血与梗死后肌钙蛋白和肌红蛋白的观察[J].现代生物医学进展,2007,(6):886-887+890+971.
- [7]申成斌,王兆福,胡丙杰.实验性早期心肌梗死的免疫组化研究[J].河南医学研究,2003,(02):119-123.
- [8]胡丙杰,冯绮明,汪冠三,等.心肌梗死6项免疫组化指标的死后稳定性比较[J].中国法医学杂志,2003,(04):208-211+221.

[9]Semenza GL.Hypoxia-inducible factor 1:master regulator of O₂ homeostasis. Curr Opin Genet Dev.1998Oct;8(5):588-94.

[10]Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domain of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. J Biol Chem. 1997 Aug 1;272(31):19253-60.

[11]李志刚,王江峰,成建定,等.缺氧诱导因子1 α 在急性心肌缺血中的表达规律[J].中山大学学报(医学科学版),2006,(03):306-309.

[12]BlancoPampín J, García Rivero SA, Otero Cepeda XL, Vázquez Boquete A, Forteza Vila J, Hinojal Fonseca R. Immunohistochemical expression of HIF-1 α in response to early myocardial ischemia. J Forensic Sci. 2006 Jan;51(1):120-4.

[13]杜中波,毛瑞明,高卫民,等.大鼠急性心肌梗血早期缺氧诱导因子-1 α 的表达[J].法医学杂志,2012,28(05):327-332.

[14]XuXH, Chen JG, Zhu JZ. Primary study of vascular endothelial growth factor immunohistochemical staining in the diagnosis of early acute myocardial ischemia. Forensic Sci Int. 2001 Apr 15;118(1):11-4.

[15]毛瑞明,杜中波,高卫民,等.大鼠急性心肌梗血后血管内皮生长因子的表达变化[J].法医学杂志,2012,28(03):179-184.

[16]王志勇,李政,陈新山.大鼠急性心肌梗血早期内皮素的免疫组化染色观察[J].中国法医学杂志,2003,(04):205-207.

[17]马孟云,徐小虎.心肌缺血内皮素RT-PCR初步研究及其意义[J].法医学杂志,2005,(01):21-23+26.

[18]Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. J Mol Cell Cardiol. 2011 Oct;51(4):600-6.

[19]袁翔天,彭雪,靳占峰.急性心肌梗血猝死心肌中FAP α 和TGF- β 1的表达[J].法医学杂志,2012,28(01):18-20.

[20]毕海涛.早期心肌梗死死后诊断的法医学应用研究[D].河北医科大学,2013.

[21]刘英坤,钟志玖,班期.诊断早期心肌缺血三种组织学染色方法的比较[J].哈尔滨医科大学学报,2002,(03):238-239+259.

[22]胡志红,吴萍.心肌Heidenhain染色诊断早期心肌梗血的实验观察[J].临床与实验病理学杂志,2011,27(6):642-644.

[23]陈学士,褚俊.免疫组织化学及特殊染色技术在法医损伤病理学鉴定中的应用[J].法医学杂志,2021,37(5):666-672.

[24]官大威,赵锐,王林林.法医学损伤时间推断:过去、现在与未来[J].法医学杂志,2019,35(02):131-135.

作者简介:

陈忠婕(2000--),女,汉族,浙江人,单位:中国刑事警察学院,硕士研究生在读,研究方向:法医病理学。