

扫描电子显微镜观察纤维蛋白 推断生前与死后损伤

吕俊苞 祝家镇

(法医学教研室)

生前与死后损伤的鉴别是法医损伤鉴定中的一项主要内容,但目前通用的组织学方法对生前短时间(4小时内)的损伤难以作出正确的判断^[1],组织化学的方法^[1,2]和生物化学的方法^[1,3]虽均有裨益,但对经水浸泡的尸体就难以解决问题,因而有必要寻找更有效的鉴别方法。

七十年代以来,Boehm与Tschomakov^[4],Boehm^[6],高部^[6]等人报告应用扫描电子显微镜(SEM)可观察到皮肤切创生前损伤后短时间即有纤维蛋白在创壁上形成,与死后损伤不同,故认为可用来鉴别早期的生前与死后损伤。但他们的研究尚未得到广泛的证实,且对尸体上纤维蛋白形态的改变及应用此项检查于各种不同损伤鉴定的可能性尚缺乏系统的探索。国内迄今未有报道。

材料和方法

选用健康豚鼠,剪净背部的毛,在其上做成损伤。以开胸剪去心脏时间为死亡时间。

实验分组

(一)生前与死后切创在死后不同时间取材比较。

豚鼠11只,在背部皮肤作生前5分钟及死后5分钟切创,深达皮下,创口长轴与脊柱垂直,长2厘米,于死后2、24、48、72小时取材,得生前5分钟伤及死后5分钟伤标本各17个。

(二)尸斑对生前及死后切创的影响。

豚鼠6只,在背部皮肤作生前5分钟及死后5分钟切创,死后将尸体悬空吊起,使伤口部位形成尸斑,室温放置,于死后24、48、72

小时取材。得生前伤及死后伤标本各18个。

(三)水浸对生前及死后切创的影响。

豚鼠4只,在背部皮肤作生前5分钟及死后5分钟切创,死后将豚鼠浸没于水中,每天换水一次,并测水温。水浸48、96、144小时取材。得生前与死后切创标本各12个。

(四)生前及死后不同时间切创的比较。

豚鼠一只,在背部皮肤作生前60、30、15、5、1分钟及死后15、30分钟切创,生前伤于死后立即取材,死后伤于成伤后5分钟内取材,得标本7个。

(五)擦伤的观察。

豚鼠3只,在背上作生前5分钟及死后5分钟擦伤,擦伤范围约0.2厘米×1.5厘米大小,死后12小时取材,得生前与死后擦伤标本各3个。

(六)人检材观察。

11例尸检皮肤,其中刺、切创8例(生前伤7例,死后伤1例),擦伤3例(生前伤2例,死后伤1例),生前刺创均在死前1小时内成伤,取材时间最长为死后48小时。

(七)盲测。

豚鼠5只,作生前5分钟及死后5分钟切创,死后20分钟取材,取材时使豚鼠尸体血液污染创口,致肉眼无法区分其为生前或死后伤,共10个标本。

检材处理

将检材分成两半,一半用甲醛固定作石蜡切片,HE及MSB^[7]染色,光镜观察。另一半检材用0.1M磷酸盐缓冲液(pH7.2)清洗,2%戊二醛固定12小时,然后将标本修整成小块,保留所要观察的创壁,用针挑开创壁上的血

痂,再用0.1M磷酸盐缓冲液(pH7.2)冲洗,经酒精脱水,醋酸异戊酯置换,临界点干燥,喷镀黄金膜后,SEM观察^[8]。SEM型号为日立S-450。

结 果

(一)切创。

1.生前5分钟切创于死后2小时取材,在创壁均有纤维蛋白网形成〔图1〕,表面一薄层纤维蛋白粗细不等,但排列紧密。深层的纤维蛋白粗细较一致。交叉重叠,组成均匀细致的纤维蛋白网包绕着红细胞,纤维蛋白表面附有微细的颗粒样物,高倍观察($\times 15,000$)可见部分纤维蛋白上有黑白相隔的横纹,同时可见纤维蛋白紧附于创壁胶原纤维上。若从侧面观察,还可见纤维蛋白渗入创壁胶原纤维之间。死后经24、48、72小时取材(室温 $15\sim 17^{\circ}\text{C}$),则表层纤维蛋白上逐渐有微生物生长,但深层的纤维蛋白网仍完整。

2.尸斑部位的生前5分钟切创,经24、48、72小时(室温 $13\sim 15^{\circ}\text{C}$),在创壁血凝物深层均观察到典型的纤维蛋白网〔图2〕。其形态结构与非尸斑部位处生前损伤所见的纤维蛋白网相同。

3.生前5分钟切创水浸48、96小时(水温 $15\sim 18^{\circ}\text{C}$),创壁仍见纤维蛋白网〔图3〕。水浸144小时后,2例检见纤维蛋白网,其余2例则只见大量细菌在创壁生长,未检出纤维蛋白网。

4.不同时间的生前切创均检见纤维蛋白网。生前1分钟成伤〔图4〕与生前较长时间成伤的创壁比较,则纤维蛋白数量较少,且纤维蛋白网结构也稀疏不匀,生前5、15、30、60分钟成伤的标本,纤维蛋白网结构未见明显差异。

5.所有死后切创,均未见与生前伤的纤维蛋白网相似的结构。

(二)擦伤。

生前擦伤皮肤(3例)伤面均见纤维蛋白网〔图5〕,而死后伤(3例)则无。

(三)人检材。

9例生前伤(7例刺创、2例擦伤)均见纤维蛋白网,形态结构与动物实验所见相似。2例死后伤(1例切创、1例擦伤)未见纤维蛋白网。

(四)盲测。

10例豚鼠皮肤检材,按创壁上有无纤维蛋白网形成及其形态和分布来区分生前与死后伤,结果均准确。

(五)HE及MSB的观察结果。

在用HE及MSB染色的对照实验中,HE片上纤维蛋白染红色,无特殊颜色,不易与其他蛋白性成分鉴别。MSB能使纤维蛋白染上特殊染色,在光学显微镜下显出浅蓝色网状结构。在52例生前切创标本中,只有21例MSB染色阳性(检出率40.3%),死后伤则无一例检出纤维蛋白。

讨 论

在我们的实验中,所有生前伤创壁均见纤维蛋白网形成,同时发现生前伤纤维蛋白渗透到创壁的胶原纤维之间及组织间隙内,这是生前伤形成的纤维蛋白的特点。

在所有死后伤创壁,未见类似生前伤的纤维蛋白网形成。在法医检案中,往往因死后血液污染伤口使鉴定生前抑死后损伤造成困难,我们曾用死后2小时的尸体血污染死后伤创壁,然后用电镜观察,可见到创壁表面有少量松散的纤维蛋白,并不相互连结成紧密的纤维蛋白网结构,纤维蛋白的形态亦与生前伤创壁上所见不同,这与Boehm^[4,9]的观察结果相同。在进行盲测试验时,将死后20分钟的尸体血液污染伤口创壁,根据形态仍可与生前伤创壁上的纤维蛋白网区分,故表明损伤即使被死后血液所污染,用电镜观察纤维蛋白网的形态结构仍有可能将其区别。

MSB染色法虽能使纤维蛋白染色,但阳性检出率只有40.3%,这可能是形成的纤维蛋白量少,光镜分辨率低之故。同时纤维蛋白网的微细形态结构也不能清楚显示,与MSB纤维蛋白染色法相比,SEM更灵敏,更准确,

能够清楚显示出纤维蛋白的微细结构及纤维蛋白网的形式和分布,有助于更准确地推断生前与死后伤。

Boehm^[4]和高部^[6]均认为生前伤中纤维蛋白量及网的形态结构随着损伤时间而改变,随着损伤时间的延长,纤维蛋白量更多,网的结构更完整,但未明确说明这种变化与损伤时间的准确关系。在我们的实验中,生前1分钟切创壁纤维蛋白网仅薄薄一层,纤维蛋白交叉重迭形成的网眼很大,创壁上的胶原纤维很多尚未被纤维蛋白覆盖。在生前5、15、30、60分钟切创创壁,纤维蛋白网层更厚更密,深层的纤维蛋白网更均匀细致,网眼细,大小较均匀,并紧密包绕着红细胞。将生前5、15、30、60分钟切创相互比较,纤维蛋白的形态及网的结构未发现很大差别,但将它们与生前1分钟切创相比,则见纤维蛋白网更厚更密集。提示根据纤维蛋白网的形态不同可以粗略估计生前数分钟内伤口的死伤时间。

在擦伤实验中,生前伤出现纤维蛋白网,死后伤则无,提示应用SEM观察纤维蛋白来推断生前或死后擦伤也是一个有用的方法,但这需要再用更多的材料进行验证。

将生前切创放置三天后取材,仍能在创壁上检出纤维蛋白网,同样结果亦能在尸斑部位放置三天才取材的生前伤创壁上见到,虽然这时血凝物表面可能有细菌生长,使一部分纤维蛋白破碎,但血凝物深层的纤维蛋白网仍基本可以辨认,这表明生前形成的纤维蛋白网性质相当稳定,可能用于实际检案。死后切创虽放置在尸斑部位,但并无纤维蛋白网形成。

我们曾将生前的血凝块用自来水浸泡5天(水温28℃,每天换水),纤维蛋白仍清晰可见。生前伤水浸(18℃)4天仍能在创壁上检出纤维蛋白网,说明生前伤纤维蛋白耐水浸泡,性质稳定,可用于对水中浮尸的损伤鉴定。尸体在水中浸泡6天后,4例生前伤中只有2例检出纤维蛋白网,另2例因细菌大量繁殖,将纤维蛋白分解破碎,网的结构不复存在,只见到大量细菌遍布于创壁上,但创壁的

胶原纤维还很完整,说明这时细菌的养料来源并非胶原,也说明胶原比较能耐受细菌的破坏。同时,将水浸6天的生前伤与同一尸体上水浸6天的死后伤比较,发现死后伤创壁胶原纤维上附着的细菌很少,胶原纤维基本完好,说明伤口上的血凝物比胶原易于受细菌侵袭,在同一尸体上不同伤口出现上述这两种情况,可能间接提示密布细菌团而胶原纤维完整的创壁可能曾有血凝物附着。在法医学实践中,长期以来对水中尸体上损伤的生前死后鉴别一直是个难题,本文的材料表明,SEM对解决这一问题可能有重要作用,值得作更深入的探讨。

人检材观察结果与动物实验相符。盲测10例豚鼠皮肤切创亦证实用SEM观察纤维蛋白可区分生前与死后伤,表明SEM可应用于实际检案。

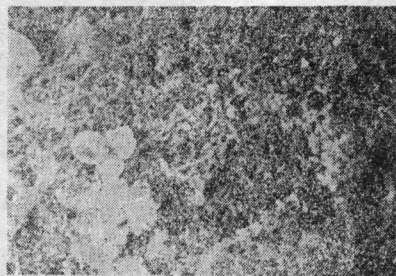
小 结

本文材料证明,根据SEM观察创壁形成的纤维蛋白网的特征可区分生前与死后切创。

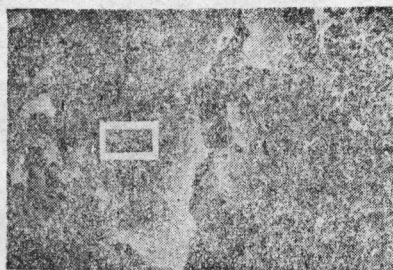
至少在死后72小时内,生前切创形成的纤维蛋白网不受死后经过时间的影响。静水浸泡(18℃)4天的尸体上生前伤仍能检出纤维蛋白网,如果水温更低,腐败过程减慢,则纤维蛋白的保存时间当更可延长,这在法医案例鉴定中具有重要意义。

鉴别擦伤是否生前形成,SEM观察可能是个有效的方法,值得进一步研究。

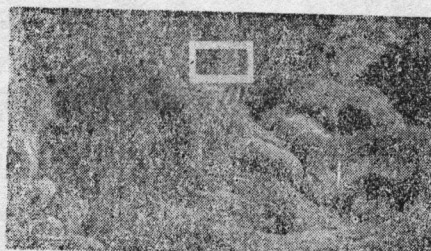
本文研究过程中得到本院电镜室罗天锡老师及郑树霖技士帮助,特此致谢。



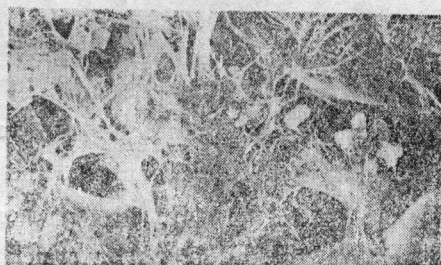
〔图1〕生前5分钟皮肤切创,创壁上密集的纤维蛋白网。×1,500



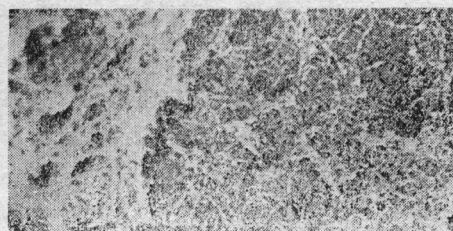
〔图 2〕 生前 5 分钟皮肤切创，尸斑部位放置 3 天，创壁上仍见密集纤维蛋白网。×1,000



〔图 3〕 生前 5 分钟皮肤切创，水浸 2 天，仍见创壁上附着纤维蛋白网。×1,000



〔图 4〕 生前 1 分钟皮肤切创，创壁上的纤维蛋白网。×1,000



〔图 5〕 生前 5 分钟皮肤擦伤，伤面已形成密集纤维蛋白网。×5,000

参 考 文 献

- [1] Raekallio J: Timing of wounds in forensic medicine. Jap J Legal Med 30(3):125, 1976
- [2] 瞿清云、祝家镇: 生前及死后伤皮肤中的酯酶活性。中山医学院学报 4 (1): 11, 1983
- [3] 陈玉川、祝家镇: 皮肤 5-羟色胺含量测定在推断损伤时间上的价值。中山医学院学报 5 (1):33, 1984
- [4] Boehm E: Three-dimensional structure of wound surfaces—a contribution to the study of local vital reaction and the determination of the age of wounds. In: Scanning Electron Microscopy p571, IITRI; Chicago, 1975
- [5] Boehm E: Demonstration of early local vital reactions by combination of morphological investigation method. Z Rechts-med 81(3):191, 1978
- [6] 高部福太郎: Experimental studies on vital reaction in skin wound. Jap J Legal Med 32(6):333, 1979
- [7] 中山医学院病解教研室: 病理特殊染色和组织化学技术手册。1980
- [8] 洪涛: 生物医学超微结构与电子显微镜技术。第 183 页, 科学出版社, 1980
- [9] Boehm E and Hochkirchen K H: Zur ultrastruktur vitaler, postmortaler und autolysierter gerinnsel. Forensic Sci Int 21 (2):117, 1983

Differentiation between Ante- and Post-mortem Skin Wounds by Observation of Fibrins under Scanning Electron Microscope (SEM)

Lu Junbao Zhu Jiazhen

(Department of Forensic Medicine, Sun Yat-sen University of Medical Sciences)

Abstract

This is the first report in China concerning the timing of skin wounds by observation of fibrin under SEM.

The authors found that in all antemortem wounds inflicted at 1 minute up to 60 minutes before death, fibrin networks are demonstrable on the wound surface, and can be seen penetrating into the spaces among the collagen fibers, while in all postmortem wounds such changes could not be demonstrated. Therefore formation of fibrin network on the wound surface is an early local vital reaction.

The fibrin network of antemortem wound is not effected by the time after death as long as 72 hrs. and by liver mortis. At fourth day of submersion in water, fibrin network is also detectable on the antemortem wound surface. Same results are observed on human skin wounds in 11 cases. In simple blind experiments on ten guinea pigs the differentiation between ante- and post-mortem skin wounds is completely correct. This suggests that SEM technique would be of value in medicolegal practice.

The authors also found that the observation of fibrin under SEM is more reliable than with histological staining method HE or MSB.