

死亡时间推断方法的研究进展

魏洪松 综述 崔文 审校

(济宁医学院法医学与医学检验学院 山东 济宁 272067)

摘 要 准确的推断死亡时间,一直是法医实践工作中的重点和难点,本文就目前常用的傅立叶变换红外光谱技术、彗星试验、显微分光光度术及流式细胞技术在死亡时间推断中的应用作一综述,旨在为死亡时间推断的研究提供参考。

关键词 死亡时间;傅立叶变换红外光谱;彗星试验;显微分光光度技术;流式细胞技术

中图分类号:D919 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9760(2014)06-193-04

死亡时间(time of death)在法医学上是指机体死后经过时间或死后时间间隔(postmortem interval,PMI),即检验尸体时距死亡发生时的时间间隔。死亡时间推断即推断死后经历或间隔时间,是法医学鉴定中需要解决的重要问题之一。传统方法是根据尸体变化(超生反应、尸温、尸斑等)、尸体昆虫等^[1-3]来进行 PMI 推断,但易受到外界环境因素的影响,准确性不高。近年来,中外法医学者提出了许多新的研究方法及技术,本文就其中的傅立叶变换红外光谱技术(Fourier transform infrared,FTIR)、彗星试验、显微分光光度术,在死亡时间推断研究中的应用作一综述。

1 FTIR

FTIR 主要由红外光源经准直后变成平行光出射,由探测器测量得到干涉图,经快速傅里叶变换后能迅速识别并分析出该能量所对应的物质的分子结构及含量。具有扫描速度快,分辨率高且不对组织损毁和产生化学变化等^[4]优点,大量应用于组织细胞等复杂体系的研究。因此,FTIR 可作为一种实用的技术用于死亡时间的推断。

黄平等^[5]应用 FTIR 分析大鼠死后组织、人体离体组织随死亡时间推移的化学降解过程实验,结果表明,人体心脏、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏皮质、骨骼肌、大脑皮质和大鼠光谱变化相似。随着时间的变化,大鼠组织、人离体组织的 FTIR 光谱主要吸收峰没有明显变化,但其峰强随着死亡时间增加呈现出 3 种不同的变化方式:增加、下降、稳定,且不同峰强比显示出了相似的时间变化趋势。大鼠肝

组织、肾皮质、脾组织的峰强和峰强比变化比骨骼肌、心脏、肺脏的变化更为明显。在 20℃ 下,死后 24h 内可观察到大鼠脾组织和肾皮质吸收峰变化,且有统计学意义($P < 0.05$);而在 24h 后才能观察到心脏、肺脏、骨峰强比的变化。故可认为脾组织和肾皮质适合早期 PMI 推断,心脏、肺组织、骨骼肌可用于晚期 PMI 推断。同样有研究表明^[6],脾和肾皮质光谱可以有效进行 24h 内早期 PMI 推断。另有学者^[7-8]在 20℃ 外界条件下,以心脏、肝组织、脾脏、肺组织、肾皮质、骨骼肌作为样本,观察死后 FTIR 光谱吸收峰在大鼠组织和人离体组织的变化。结果发现,在 1238、1080、1396 cm^{-1} 吸收峰下,大鼠在死后 24h 内其心脏、肺组织、骨骼肌可以观察到不同变化,但其他吸收峰在相邻死亡时间点变化很小,无法区分。在死后,大鼠的脾脏和肾组织自溶发生早、速度快,24h 后脾脏和肾皮质吸收峰峰强及峰强比差别明显,72h 后便可见组织液化发生,168h 后组织固体成分无法提取,但在死后 120h,可观察到脾和肾皮质吸收峰峰强平台期变化趋势缓慢,相邻死亡时间点不能区分,考虑可能是在死后晚期这些组织已处于完全溶解状态^[9]。而心脏和骨骼肌组织在死后 168h 保持固体状态,故在死亡晚期,大鼠的心脏、肺组织、骨骼肌 FTIR 光谱下降趋势要比脾脏和肾组织明显,可考虑这 3 个器官进行晚期 PMI 推断^[10]。虽然 FTIR 光谱可以检测不同组织及器官在死亡早期和晚期光谱学的变化,但由于离体组织和在体组织的客观环境条件存在很大差异,是否具有相似的拟合曲线方程及光谱的规律性变化,尚需进一步研究探讨。因此,

在建立使用 FTIR 推断 PMI 的数据库时,不能仅用离体器官组织的样本数据,而应收集不同犯罪现场、不同死因及不同周围环境条件下的在体样本信息,这将是 FTIR 推断 PMI 的数据库建立的基础措施。

2 彗星试验

单细胞凝胶电泳技术(singlecell gel electrophoresis, SCGE),是 Ostling 等于 1984 年首次提出,由于细胞电泳形状与彗星颇似,又称彗星试验(comet assay)。它能直接检测并分析死后机体组织细胞 DNA 的降解情况。在碱性条件电泳后,已发生降解的细胞则形成彗星样的尾部,而未降解的 DNA 细胞呈无尾圆形荧光核心,即彗星头部。随着时间的延长 DNA 降解增多,彗星头逐渐变小,彗星尾逐渐增长。故通过测定“彗星样”细胞出现率(计数一定量细胞其中彗星样细胞所占的比例)、头半径、头面积、尾长度、尾矩、尾面积、头/尾 DNA 含量比例、Oliver 矩等参数,可监测细胞核 DNA 降解变化趋势,对 DNA 降解程度进行定量分析^[11]。

易少华等^[12]用彗星试验检测大鼠死后脾细胞 DNA 降解变化,结果发现,彗星头和尾 DNA 含量、尾长度、尾面积、Oliver 矩等参数与 PMI 呈线性相关关系。安妮等^[13]在应用彗星试验对兔骨髓细胞核 DNA 降解变化的研究中,借助专业的计算机图像分析技术软件,对不同部位及不同死亡时间内骨髓有核细胞 DNA 降解进行检测,结果表明,处于不同部位骨髓有核细胞核 DNA 随死亡时间发生的不同程度的降解,其降解程度与死亡时间之间呈相关性。郑吉龙等^[14]应用彗星试验研究小鼠器官细胞核中 DNA 降解变化与死亡时间的关系的实验中,测定小鼠在死后 72h 内不同时间点骨骼肌、心、肝、肾、脑细胞核内头 DNA 含量、头半径、尾 DNA 含量、尾长度、尾矩、Olive 矩、尾面积等 8 项参数的变化值。结果,在小鼠死亡 72h 内,彗星尾 DNA 含量、尾长度、尾矩、尾面积、Olive 矩都呈增加趋势,头 DNA 含量、头半径、头面积均呈下降趋势。实验结果同时表明,死后核 DNA 降解速率与组织来源有关,其中脑组织最早发生降解,然后依次为肝、肾、心和骨骼肌组织。同时对以上 8 个测量参数综合分析,发现肝组织与死后间隔时间的

相关性较强,各参数近似呈直线相关,在回归分析中相关系数较高,因此,在应用 DNA 降解分析来推断 PMI 中,肝组织是较理想的器官。另外,在实验中发现,在同一条件下,同一参数的测量值在同一样本不同细胞之间具有差异,这表明,在相同组织内 DNA 降解程度在不同细胞之间也具有差异性,考虑可能与细胞之间环境细微差别有关。李晓娜等^[15]在应用彗星试验研究兔牙髓细胞核 DNA 降解的实验中,通过对上述参数指标测定,也得出与郑吉龙等相一致的实验结果,同时并将每个参数的测量值进行了多项式运算,获得了更能体现 DNA 降解趋势的二项式回归方程,具有显著的统计学意义($P < 0.001$)。明绍利等^[16]应用彗星试验研究在牙齿离体后 72h 内,牙髓细胞核 DNA 降解规律,实验结果发现,牙髓细胞核 DNA 彗星电泳的多个彗星参数(彗星头 DNA、尾 DNA、Olive 尾矩等)与 PMI 之间呈线性关系。应用彗星试验推断 PMI 具有以下优势^[17]:1)简捷迅速,从采样到结果分析的过程时间短,为现场勘察和大样本量分析提供了可能;2)灵敏度高,能有效测定每 $1.657 \times 10^{-1} \text{ kg}$ 中 0.1 个 DNA 的断裂;3)需要量少,每份样品一般只需 1000 个细胞;4)安全性高,无需放射性标记。因此,彗星试验将会成为推断死亡时间精确、客观的新方法。

3 显微分光光度测定技术

显微分光光度测定技术(microspectrophotometry)是根据某些物质分子对光波进行选择吸收的原理,在显微镜下对样品中的微细结构内的化学物质进行测定的技术,因“显微镜”具有使样品图像放大,提高灵敏度的部分作用,故被分析的样品量可以非常低,能精确测定样本中的一个细胞,甚至核仁内的核酸、酶和其他极微量物质的含量。其中常用的测量方法有扫描测量法、单波长法、荧光光度法。目前,由于荧光光度法在测定细胞内的 DNA、RNA、蛋白质、氨基酸和生物胺的相对含量中具有灵敏度高的优点,广泛应用于 PMI 推断的研究中^[18]。2000 年,Hiroschi Ikegaya^[19]在对死后 0~4d 内大鼠的脑、肝、心、肾等器官中细胞色素 c 氧化酶(COX)的活性进行测定的实验中,发现 COX 活性的变化趋势与大鼠死亡时间呈相关性,其中 COX 在心、脑、肾中的活性相似,而远高于

肝、肺组织,这与 Anthony G 等^[20]及 Rohdich F 等^[21]的研究结果相一致。因此,不同器官组织中的 COX 的活性高低可作为死亡时间推断参考指标。2008 年,李伟等^[22]通过测定不同死亡时间大鼠右心内血浆吸光度的变化趋势,结果发现血浆的吸光度与死亡时间呈正相关($P<0.01$)。2009 年,刘茜等^[23]同样采用生物荧光发光法测定大鼠死后肌肉组织中微生物 ATP 含量,结果发现,微生物 ATP 的含量与死亡时间之间呈正相关,因而成为一个推断晚期 PMI 的参数,但受嗜尸性昆虫等外界不确定因素的影响准确性不高。2009 年,日本学者 Yosuke 等^[24]在应用显微分光光度术对死后 72h 内的 21 例尸体皮肤颜色研究观察中,发现其中 31 个颜色参数指标变化趋势与死亡时间呈相关性。另有学者^[25]过显微分光光度术研究发现,死后 72h 内尸斑变化(色度、色泽等指标)与死亡时间具有相关性,这为早期 PMI 的推断提供了新思路。

4 流式细胞技术

流式细胞技术(flow cytometry,FCM)是利用流式细胞仪进行的一种单细胞高速准确定量分析和分选技术。通过测定 RNA、DNA 及细胞体积等参数,对细胞进行高纯度的分类。流式细胞术是单克隆抗体及免疫细胞化学技术、激光和电子计算机科学等高度发展及综合利用的高技术产物。后来,DiNunnoticedN^[26-27]、王慧君^[28]应用 FCM 技术定量对死亡机体所具有的不完整 DNA 的细胞数目检测,并与完整 DNA 的细胞数目相比较,结果证实,随着死亡时间的延长,两者的百分比比例升高,可作为 PMI 推断的依据。2003 年,Valet G 等^[29]应用流式细胞技术结合图像分析系统,提高了细胞 DNA 含量测定的精确性,促进了应用该项技术进行 PMI 推断的发展。张伯暘等^[30]应用流式细胞仪测定肝组织中含不完整 DNA 的细胞数所占百分比,来研究人体死后肝脏细胞 DNA 含量变化与死亡时间的关系及影响因素实验中,结果表明,随死亡时间的延长 DNA 含量逐渐增高,与死亡时间之间具有相关性。在两种高、低不同环境温度条件下,死后 24~72h 内人肝细胞 DNA 含量随死亡时间的延长逐渐增高,与死亡时间之间具有相关性。这与齐凤英等^[31]应用 FCM 技术对死后不同时间大鼠的心、肾、肝等组织的 DNA 含量变化以及 Ci-

na^[32]对死后人脾组织细胞 DNA 含量变化的研究结论相一致。然而,在使用流式细胞技术时,需将制作成单细胞悬液,单细胞悬液的细胞数不应少于 10000 个,并且只对完整的细胞分析,因此在死亡时间推断中的具有一定的局限性。

5 小结

PMI 的推断历来是法医病理学研究的热点问题,尽管国内外法医学者提出了许多研究方法或学说,如根据超生反应检测、离子检测、酶检测、DNA 降解程度检测等推断死亡时间,但这些方法在实际工作中的应用尚有较大距离,问题仍然没有很好地解决。需要我们继续深入研究。但是,仅靠某一指标进行死亡时间推断,其准确性不高且难以广泛应用。因此,应不断拓宽研究范围,综合多种影响因素的多参数综合推断死亡时间,提高其准确性^[35]。

参考文献:

- [1] Fierro MF. Cadaveric spasm[J]. Forensic Sci Med Pathol, 2013,9(2):253.
- [2] Ozawa M, Iwadata K, Matsumoto S. The effect of temperature on the mechanical aspects of rigor mortis in a liquid paraffin model[J]. Leg Med (Tokyo), 2013,15(6):293-297.
- [3] 谢丹,彭钰龙,郭亚东,等.法医昆虫学死亡时间的推断与 Daubert 规则之思考[J].法医学杂志,2013,29(4):290-294.
- [4] Mello ML, Vidal BC. Analysis of the DNA Fourier transform infrared microspectroscopic signature using an all-reflecting objective[J]. Micron, 2014,6(61):49-52.
- [5] 黄平,王世伟,白杰,等.应用 FTIR 光谱技术推断死亡时间[J].中国法医学杂志,2011,26(2):104-108.
- [6] 柯咏,王世伟,鲁庆阳,等.大鼠死后脑组织 FTIR 光谱变化与死亡时间的关系[J].光谱学与光谱分析,2008,28(11):2545-2549.
- [7] Tuo Y, Huang P, Ke Y, et al. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopic investigation of post-mortem metabolic process in rat and human kidney cortex[J]. Applied spectroscopy, 2010,64(3):268-274.
- [8] Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues [J]. App Spectrosc Rev, 2008,43(2):134-179.
- [9] 黄平.应用傅里叶变换红外光谱技术推断死亡时间的实验研究[D].西安:西安交通大学,2008:51-93.
- [10] Huang P, Tian WP, Tuo Y, et al. Estimation of postmortem interval in rat liver and spleen using Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Spectrosc Lett, 2009,42(2):108-116.
- [11] He H, Huang H, Yu T. Detection of DNA damage in sonodynamic chemotherapy against cisplatin-resistant human ovarian cancer[J]. J Biol Chem, 2013,288(12):10511-10518.

- er cells using the modified comet assay[J]. Radiat Biol, 2014, 5(14): 1-14.
- [12] 易少华, 赵小红, 刘良. 彗星试验检测死后 DNA 降解推断 PMI 的参数选择性研究[J]. 中国法医学杂志, 2008, 13(1): 1-4.
- [13] 安妮, 郑吉龙, 张艳苓, 等. 兔死后不同部位骨髓细胞核 DNA 降解规律的实验性研究[J]. 中国刑警学院学报, 2011(4): 45-48.
- [14] 郑吉龙, 李晓娜, 张晓东, 等. 小鼠死后骨骼肌、心、肝、肾、脑细胞核中 DNA 的变化规律[J]. 法医学杂志, 2010, 26(3): 161-164.
- [15] 李晓娜, 杨泽礼, 郑吉龙, 等. 单细胞凝胶电泳技术研究兔骨髓细胞核 DNA 降解的时间效应[J]. 中国医学工程, 2012, 11(7): 15-19.
- [16] 明绍利, 郑长发, 张海宁, 等. 离体人牙髓细胞 DNA 降解规律实验性研究[J]. 中国医学工程, 2013, 12(21): 74-76.
- [17] 卢韦, 华琳. 彗星试验技术在死亡时间推断中的应用与进展[J]. 科技信息, 2013(5): 463-488.
- [18] Huang H, Larsen MR, Palmisano G, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of porcine muscle within 24h postmortem[J]. J Proteomics, 2014, 106C: 125-139.
- [19] Ikegaya H, Iwase H, Hatanaka K, et al. Postmortem changes in cytochrome c oxidase activity in various organs of the rat and in human heart[J]. Forensic Sci Int, 2000, 108(3): 181-186.
- [20] Anthony G, Stroth A, Lottspeich F, et al. Different isozymes of cytochrome c oxidase are expressed in bovine smooth muscle and skeletal or heart muscle[J]. FEBS Lett, 1990, 27(1-2): 97-100.
- [21] Rohdich F, Kadenbach B. Tissue-specific regulation of cytochrome c oxidase efficiency by nucleotides[J]. Biochemistry, 1993, 32(33): 8499-8503.
- [22] 李伟, 柯咏, 贺光社, 等. 大鼠死后血浆吸光度变化与死亡时间关系的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(12): 2944-2946.
- [23] 刘茜, 翁义星, 杨帆, 等. 大鼠肌肉中微生物 ATP 含量及其在死亡时间推断中的应用[J]. 法医学杂志, 2009(2): 81-84.
- [24] Usumoto Y, Hikiji W, Sameshima N, et al. Estimation of postmortem interval based on the spectrophotometric analysis of postmortem lividity[J]. Legal Med, 2010, 12(1): 19-22.
- [25] 张敏, 韩玮, 唐晖, 等. 定量组织化学技术在死亡时间推断中的应用[J]. 中国人民公安大学学报(自然科学版), 2011(1): 23-26.
- [26] Di Nunno N, Costantinides F, Cina SJ, et al. What is the best sample for determining the early postmortem period by on-the-spot flow cytometry analysis[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2002, 23(2): 173-180.
- [27] Di Nunno NR, Costantinides F, Bernasconi P, et al. Is flow cytometry evaluation of DNA degradation a reliable method to investigate the early postmortem period[J]. Am J Forensic Med and Pathol, 1998, 19(1): 50-53.
- [28] 王慧君, 王先松, 饶广勤, 等. 死后组织 DNA 变化与死亡时间关系的研究[J]. 刑事技术, 2000(1): 9-10.
- [29] Valet G. Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2003, 17(3): 213-220.
- [30] 张伯阳, 侯小燕, 王希钢, 等. 人体死后肝细胞 DNA 含量与死亡时间关系的研究[J]. 中国法医学杂志, 2009, 24(4): 220-223.
- [31] 齐凤英, 许树棠, 刘汝俊, 等. 死后不同时间的组织细胞 DNA 含量分析[J]. 中国法医学杂志, 1989, 4(2): 213-215.
- [32] Cina SJ. Flow cytometric evaluation of DNA degradation: a predictor of postmortem interval[J]. Am J Forensic Med Pathol, 1994, 15(4): 300-302.
- [33] C Zapico S1, Menéndez ST, Núñez P. Cell death proteins as markers of early postmortem interval[J]. Cell Mol Life Sci, 2013 Dec 3[Epub ahead of print].

(收稿日期 2014-05-15)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对论文著录通信作者的要求

本刊对论文中著录通信作者的要求: 1) 论文属于某课题的重要内容之一, 论文作者又不是课题总负责人时, 应标注通信作者。2) 通信作者应该是课题负责人、研究生导师、论文的指导者, 且具有高级技术职称; 3) 一篇论文一般只列一位通信作者; 4) 参照国家标准《文后参考文献著录规则》对著录责任者的要求, 通信作者在论文作者排序中一般可排序为第二或最后; 5) 著录作者时在通信作者右上角标注“△”, 通信作者简介放在论文首页左下脚, 并标出 E-mail 地址; 6) 综述类文章不设通信作者。

学报编辑部