论著

文章编号:1000-5404(2005)08-0796-03

死后5~36 h人脑细胞DNA降解含量的图像分析

舒细记[1],王树法[2],李 艳[3],任 亮[1],刘丽江[3],刘 良[1] ([1]华中科技大学同济医学院法医系,武汉 430030;[2]湖北警官学院侦查系,武汉 430034;[3]江汉大学医学与生命科学学院,武汉 430056)

提 要:目的 通过对死后5~36 h脑细胞降解后残存DNA含量的定量分析来推断其早期死亡时间。**方法** 选取32例已知死亡时间的人体脑组织,在死后5~36 h内每小时进行细胞学涂片、Feulgen-Vans染色,采用图像分析技术检测反映脑细胞核DNA含量的平均光密度、积分光密度、平均灰度等灰度参数,分析脑细胞残存DNA的含量与其对应的死亡时间的变化规律。**结果** 在5~36 h内平均光密度、积分光密度随死亡时间的延长而逐渐减小、平均灰度逐渐增大,且其均值均与死亡时间显著性相关,并得出对应的回归方程。**结论** 反映人脑细胞DNA含量改变的灰度参数均与死亡时间有明显的相关性,是推断早期人体死亡时间的有效的定量指标。

关键词:法医病理学;早期死亡时间;DNA降解;图像分析

中图法分类号:D919.4; R322.81; R446.8 **文献标识码**:A

Changes of DNA content of human brain cells in different postmortem interval by image analysis

SHU Xi-ji[1], WANG Shu-fa[2], LI Yan[3], REN Liang[1], LIU Li-jiang[3], LIU Liang[1] ([1]Faculty of Forensic Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030; [2]Faculty of Spy, Hubei Police College, Wuhan 430034; [3]College of Medicine and Life Sciences, Jianghan University, Wuhan 430056, China)

Abstract: Objective To analyze changes of DNA content in human brain nuclei and seek a new experimental method to deduce the postmortem interval (PMI) by computer image-analyze technique. **Methods** The brain tissue from 32 cadavers with the accurate PMI, was sampled and smeared respectively every hour within the first 36 h after death, fixed with cold Carony fixation, stained by Feulgen-Vans method. Three detective indexes of DNA in brain nuclei were detected by using the image-analyze instrument, including integral optical density (IOD), average optical density (AOD), average gray (AG). **Results** IOD and AOD in the human brain nuclei declined regularly with the prolongation of dead time in 36 h, whereas AG rose. There was a definite relationship between PMI and gray parameters (IOD, AOD and AG). **Conclusion** Gray parameters (IOD, AOD and AG) were proved to be preferable indexes to study the DNA degeneration rate of the brain nuclei in 36 h after death and estimate PMI accurately.

Key words: forensic pathology; postmortem interval; DNA degradation; image analysis

人体死亡时间(postmortem interval, PMI)的推断一直是法医病理学的重要课题,尤其死亡早期时间的推断在刑事侦查中对犯罪嫌疑人的排查、死亡医疗纠纷的仲裁等司法实践中更具重大的现实意义。尽管已有根据早期尸体现象、胃内容物消化程度、生物物理学、组织化学、免疫组织化学等多种方法来推测早期死亡时间,但目前尚无精确、可重复的实用方法。本研究在前期动物实验的基础上应用图像分析技术探讨死后5~36 h人脑细胞残存DNA含量与早期死亡时间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

选择湖北地区2001-2003年具有确切死亡时间的32例尸体,其中颅脑损伤致死者27例(84.37%),窒息2例(6.25%),猝死3例(9.38%);男性29例(90.62%),女性3例(9.38%);年龄18~54岁,平均年龄31.5岁;尸体保存于16~25 ℃的环境中,取材的实验环境温度在17.5~25 ℃。首次取材时间均在死

基金项目:公安部科研项目基金(200342-213-04)
Supported by the Ministry of Public Security Science Foundation of China (200342-213-04)

作者简介:舒细记(1967-),男,湖北省大冶市人,博士,副主任医师,主要从事法医病理学方面的研究,现在江汉大学医学与生命科学学院,发表论文21篇。电话:(027)51259966,E-mail: shuxiji@sina.com

收稿日期:2004-11-29;**修回日期**:2005-01-08

后 5 h 内进行。

1.2　取材、涂片

无菌手术条件下取出完整的脑组织，将脑组织置于含 200 mg/L 庆大霉素的生理盐水中，18 ℃冰箱中存放 0.5 h，经抑菌处理后将其移入无菌洁净的保湿盒内（保湿盒为密封钢盒，用生理盐水浸湿的纱布垫底，钢盒使用前经常规高温灭菌处理），每隔 1 h 剪取 1 cm×1 cm×2 cm 样品 1 份，剪取部位（保证该处无生前创伤、明显淤血）统一为颞上回的脑膜下 0.1～0.5 cm 处（大脑皮质区）。样品浸入清水摆动洗涤 10 次，清洗血浆成分及血细胞，取出后滤纸吸干，均匀地轻力直线涂片。涂片后立即固定于冷 Carnoy 固定液中 0.5 h，自来水冲洗 5 min。室温晾干避光置于 4 ℃冰箱备染或保存。

1.3　染色

对图像分析组的备染涂片统一进行 Feulgen-Vans 染色，试剂配制及步骤均参照文献[1]介绍之方法并略加改进。

1.4　图像分析

采用 Motic Med 6.0 CMIAS 彩色病理图像分析系统，统一对染色后的涂片进行测量分析。测量分析由专人完成，要求其必须是受过图像分析技术培训合格的病理学主治医师（相当或以上职称），确保图像分析的规范。每次采集前均设置相同的系统环境。每张涂片高倍视野下以“弓”字形状作为采集线路（保证采集的图像无重复、交叉）取 15 个视野，每个视野采集一幅图像。通过模数转接通道数字化后以 CMP 及 BMP 格式分别将图像存盘并备份。

再从每幅图像的左上角开始以“弓”字形状随机选取 10 个孤立、分离的脑神经元细胞（以星型细胞为主；因为大脑皮质的神经元以颗粒细胞数量最多，颗粒细胞中星型细胞最多见），保证每幅图像采集的细胞无重复、交叉，进行积分光密度（integral optical density，IOD）、平均光密度（average optical density，AOD），平均灰度（average gray，AG）测量分析，获得相关的对应数据。每小时分析的细胞数 = 32 例 × 1 张切片 × 15 视野 × 10 细胞 = 4 800 细胞。测量时每次重新开启图像分析系统后均进行尺度定标、光密度定标。所有操作程序的步骤、次序一致。

1.5　统计学处理

所测数据用 SPSS 10.0 软件进行线性回归和多元回归分析。

2　结果

2.1　脑细胞各灰度参数的测量值

死后 5～36 h 内每个死亡间隔点即每小时脑细胞各灰度参数均取该死亡时间对应点所测细胞的均值结果（表 1）。

2.2　人体死亡 5～36 h 脑细胞核各灰度参数变化趋势

死后 5～36 h 人脑细胞核的灰度参数随死亡时间的延长 AG 呈上升趋势，AOD、IOD 呈下降趋势。

2.3　各灰度参数的线性回归分析

各灰度参数（AOD、IOD、AG）均与 PMI 存在显著的相关性（$P<0.01$），见表 2。

2.4　灰度参数多元线性回归分析

多元回归分析显示灰度参数整体上亦与 PMI 存在显著的相关性，其多元回归方程见表 3。

表 1　不同 PMI 脑细胞各灰度参数的测量均值

Tab 1　Mean value of gray parameters in brain nucleus at different PMI

PMI	IOD	AOD	AG	PMI	IOD	AOD	AG
5	19.61	0.54	120.2	21	15.41	0.39	138.6
6	20.11	0.55	118.1	22	15.19	0.38	139.4
7	19.12	0.52	122.8	23	15.01	0.39	139.4
8	18.92	0.53	123.9	24	14.37	0.37	141.5
9	18.45	0.51	124.4	25	14.80	0.37	145.3
10	18.01	0.53	124.6	26	14.11	0.36	144.8
11	17.70	0.49	127.9	27	13.83	0.37	146.3
12	17.19	0.50	126.8	28	13.71	0.35	145.9
13	16.54	0.47	129.7	29	13.52	0.32	147.5
14	17.01	0.47	131.5	30	13.57	0.31	148.8
15	16.86	0.45	131.9	31	13.12	0.33	150.1
16	16.50	0.44	130.6	32	13.01	0.30	153.3
17	16.10	0.42	133.2	33	12.49	0.29	156.2
18	15.66	0.43	135.0	34	12.56	0.27	157.4
19	15.78	0.41	135.6	35	12.43	0.27	158.1
20	15.47	0.43	137.1	36	12.43	0.26	159.8

表 2　各灰度参数与 PMI(h)的线性回归分析

Tab 2　Linear regression equations with PMI (h) as the dependent variable, IOD, AOD and AG as the independent varibles

Substance	Expression to calculate PMI (Regression equation)	*R* Square	Adjusted *R* Square	Std. Error of the Estimation (h)	*P*
IOD	$Y=84.434-4.103x_1$	0.976	0.976	1.46	0.000
AOD	$Y=63.725-106.237x_2$	0.983	0.982	1.26	0.000
AG	$Y=-87.767+0.783x_3$	0.987	0.987	1.07	0.000

x_1, x_2 and x_3 are representitive of measured mean of IOD, AOD, AG in order. Y is representitive of estimated PMI

表 3　各灰度参数与 PMI(h)的多元线性回归分析

Tab 3　Multiple regression model with PMI (h) as the dependent variable, IOD, AOD and AG as the independent varibles

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	*t*	*P*
Constant	B	Std. Error	β		
	1.200	16.290	0.074	0.942	
IOD	-1.236	0.321	-0.298	-3.845	0.001
AOD	-26.888	10.965	-0.251	-2.452	0.021
AG	0.358	0.081	0.454	4.437	0.000

Model statistics: *R* Square = 0.994; Adjusted *R* Square = 0.993; Std. Error of the estimation = 0.76. Multiple linear regression equation: $Y=1.200-1.236x_1-26.888x_2+0.358x_3$ (x_1, x_2 and x_3 are representitive of measured mean of IOD, AOD, AG in order. Y is representitive of estimated PMI)

3　讨论

人体死亡时间推断的传统方法是根据早期尸体现象、超生反应、尸体化学测定等推断早期死亡时间易受外界因素影响，带有一定的主观性、经验性。如尸冷被认为是死后 24 h 内推断死亡时间最有效的单因素指标，但由于机体死亡时的体温可能高于或低于 37 ℃，且不同条件下的环境温度迥异，尸体冷却的速度并不均衡一致，故而要求其精确地推断死亡时间极为困难[2]。

近10年来本课题组尝试应用计算机图像分析技术，通过对不同PMI的细胞核DNA降解后残存含量的定量分析来推断死亡时间。前期动物实验表明大鼠死后细胞核的DNA含量变化与PMI存在相关性[3,4]。本研究在前期基础上首次以人体材料为对象对不同PMI的人脑细胞DNA含量进行图像分析。结果显示在死后5～36 h内所选灰度参数(IOD、AOD、AG)均值均与PMI有统计学相关性，且得出灰度参数多元线性回归方程及各参数的线性回归方程；在死后5～36 h内IOD均值随PMI的延长呈下降趋势，R2为0.976，其中在6～13 h内IOD均值下降最快；AOD均值亦呈下降趋势，R2为0.983，其中在10～17 h内AOD均值下降最快；AG均值呈上升趋势，R2为0.987，其中在29～36 h内AG均值上升最快。本研究首次检材涂片时间为死后第5小时，由于尸体标本具有一定的特殊性，样本在完成相关法律程序后，实验起始时间难以统一控制在0～5 h内，故无死后0～5 h的完整实验数据，但前期实验表明0～6 h大鼠脑细胞DNA降解呈平台现象[4]。本研究选取IOD、AOD、AG等灰度参数分别从被测目标的像数点光密度状况、单色光平均吸收程度、平均灰度等不同角度反映DNA降解后的含量变化，即通过对Feulgen染色[4,5]后细胞核DNA含量的定量分析表明：人脑细胞核DNA降解后的残存含量规律性减少与PMI存在显著的相关性，DNA降解速率改变与PMI存在明显的对应关系。但由于各参数在反映DNA降解速率的敏感时段各有侧重，为均衡起见，可采用多参数的多元线性回归方程予以校正或综合考量。

DNA是具有显著生化稳定性的遗传物质，同物种不同组织的体细胞DNA含量是恒定的[6]。DNA在死后立即开始降解，并在死后72 h内以相对恒定的速率加速降解，且很少受死亡机制的影响[7]。由于在本研究的实验环境下死亡36 h后人脑组织自溶严重而较难被薄层涂片，故研究时间选择在死后36 h内。通常人脑组织因有坚固的屏障保护而不易受到外部挤压等直接损害，远离肠管、体表等而不易受到微生物的侵扰、腐败，故其DNA降解所受干扰相对较少。本研究的部分标本为脑损伤致死案例，检材部位均无明显瘀血、水肿，且远离创伤区域。本研究的标本采样为细胞涂片技术，因为本研究的直接目的为细胞核DNA含量的定量分析，选择细胞涂片可以较好地保证细胞核相关信息的完整性，即细胞核结构完整、组织标本新鲜；组织切片得到的细胞核形态由于切割的角度不同会出现同一细胞的切面大小不一，且只能体现某个切面的状况，不能有效地反映整个细胞核整体信息，即使通过三维重建等图像处理亦可能会导致整体信息的缺失或失真，显然，组织切片更适合于定性分析。

目前亦有以流式细胞术为主的多种研究方法[7～10]证实细胞核DNA降解与PMI存在相关性，但多数以动物为研究对象，且有明显的局限性。同时要求新鲜样本(或保存于－70 ℃)，在法医实践中难以保证。此外，推断PMI的理想参数应与PMI呈连续的线性相关，本研究所选图像分析的灰度参数亦符合该要求。图像分析技术具有可选参数多、客观性强，重复性好等特点，是推断人体早期PMI有效的定量方法，其灰度参数是推断人体PMI的有效指标，且随着计算机及信息技术日新月异，其准确性、重复性、实用性将会得到不断改善和提高。当然，本研究只是对特定温度下的人脑细胞DNA降解规律进行了定量分析，但法医学实践中的环境因素迥异，特别是温度差异可能对DNA的降解速度产生显著影响，因此，在后续研究中将予以关注，不断积累并分析各种环境因素下(特别是不同温度条件下)不同PMI对应的DNA降解速率数据、以及与PMI的相关性，为进一步建立推断人体PMI的人工神经网络多因素分析系统收集资料[12]，不断完善早期人体PMI推断方法。

参考文献：

[1] 芮菊生，杜懋芩，陈海明，等. 组织切片技术[M]. 北京：人民卫生出版社，1980. 213.

[2] Al-Alousi L M, Anderson R A, Worster D M, *et al*. Factors influencing the precision of estimating the postmortem interval using the triple-exponential formulae (TEF). Part II. A study of the effect of body temperature at the moment of death on the postmortem brain, liver and rectal cooling in 117 forensic cases[J]. Forensic Sci Int, 2002, 125(2-3): 231－236.

[3] 刘　良，林乐泉，刘　艳，等. 大鼠脾细胞DNA含量与早期死亡时间关系的图像分析研究[J]. 法医学杂志，2000，16(1)：8－9，11.

[4] 刘　良，张　力，刘亚玲，等. 大鼠脑细胞DNA含量与死亡时间关系的图像分析[J]. 中国法医学杂志，2000，15(1)：1－3，13.

[5] Giroud F, Montmasson M P. Reevaluation of optimal Feulgen reaction for automated cytology. Influence of fixatives[J]. Annal Quant Cytol Histol, 1989, 11(2): 87－95.

[6] 张益鹊. 法医病理学理论与实践[M]. 武汉：湖北科学技术出版社，1996. 33.

[7] Di Nunno N R, Costantinides F, Bernasconi P, *et al*. Is flow cytometric evaluation of DNA degradation a reliable method to investigate the early postmortem period[J]? Am J Forensic Med Pathol, 1998, 19(1): 50－53.

[8] Boy S C, Bernitz H, Van Heerden W F. Flow cytometric evaluation of postmortem pulp DNA degradation[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2003, 24(2): 123－127.

[9] Johnson L A, Ferris J A. Analysis of postmortem DNA degradation by single-cell gel electrophoresis[J]. Forensic Sci Int, 2002, 126(1): 43－47.

[10] 王成毅，郭学荣，任　亮，等. 人脾淋巴细胞核DNA含量及形态学参数的变化规律[J]. 中国法医学杂志，2002，17(4)：217－220.

[11] Wilbur D C, Zakowski M F, Kosciol C M, *et al*. DNA ploidy in breast lesions: A comparative study use two commercial image analysis and flow cytometry[J]. Anal Quant Cytol Histol, 1990, 12(1): 28－34.

[12] Bocaz-Beneventi G, Tagliaro F, Bortolotti F, *et al*. Capillary zone electrophoresis and artificial neural networks for estimation of the post-mortem interval (PMI) using electrolytes measurements in human vitreous humour [J]. Int J Legal Med, 2002, 116(1): 5－11.

(编辑　陈聪连)