

文章编号:1004-7220(2017)05-0401-06

通过脑形态及生物力学特性时序性变化推断死亡时间

汤畅¹, 刘超^{1,2}, 苏锐冰¹, 吕俊耀¹, 蔡山青¹, 徐小虎¹, 于晓军¹

(1. 汕头大学医学院 法医学教研室, 汕头 515041; 2. 福建省晋江市公安局 物证鉴定室, 晋江 362200)

摘要: **目的** 探讨家猪脑组织形态学及生物力学特性时序性变化规律及其推断死亡时间(postmortem interval, PMI)的可行性。**方法** 采集42个家猪脑组织, 25℃恒温、75%恒湿气候箱内放置, 每12 h(0、12、24、36、48、60 h; $n=6$)按照定时、定位、定向、定比、定量、定形“六定”规范切取额叶脑组织, 甲醛固定, 生物力学检测仪检测各组试件的生物力学参数并制备组织形态切片。**结果** PMI 60 h内脑组织大体呈自溶腐败变色、瘫软、泥化、液化等趋势; PMI 0~48 h脑白质间隙总面积及其累积光密度均明显增高; PMI 12~60 h极限载荷、平均力、弹性模量、断裂能量均呈下降趋势, 其中极限载荷组间差异高度显著; 平均力、弹性模量和断裂能量组间比较均差异显著。**结论** 脑组织形态结构与生物力学性状变化之间呈明显负相关构效关系, 死后0~60 h脑组织极限载荷“窗口期”最佳, 可作为推断PMI的新方法。

关键词: 法医病理学; 死亡时间; 脑组织; 生物力学; 构效关系

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.05.002

Postmortem interval estimation by time-dependent changes of morphology and biomechanical properties in brain tissues

TANG Chang¹, LIU Chao^{1,2}, SU Rui-bing¹, LÜ Jun-yao¹, CAI Shan-qing¹, XU Xiao-hu¹, YU Xiao-jun¹ (1. Department of Forensic Medicine, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China; 2. Evidence Identification Chamber, Public Security Bureau of Jinjiang City of Fujian Province, Jingjiang 362200, China)

Abstract: **Objective** To explore the regularity of time-dependent changes in morphology and biomechanical properties of brain tissues in pigs, and value the feasibility of deducing the postmortem interval (PMI). **Methods** Brain tissues were taken from 42 pigs and kept in an artificial climate chamber with the temperature of 25℃ and humidity of 75%. The samples were collected from telencephalon at sequential time intervals (0, 12, 24, 36, 48, 60 h; $n=6$) according to the principle of predefined time, position, direction, ratio, quantity and shape. The samples fixed with formaldehyde were then immediately tested by mechanical testing machine to obtain their biomechanical parameters and the histological sections were prepared. **Results** With the extension of PMI (0-60 h), brain tissues gradually became discolored, weak, mudding and liquefied under the influence of autolysis and putrefaction. Both clearance area of the white matter and its integrated optical density (IOD) significantly increased during 0-48 h. Biomechanical properties of brain tissues including the limit load, average force, elastic modulus and fracture energy all presented a declining tendency at the interval of 12-60 h. The limit load was considered highly statistically significant, and statistical differences were found in average force, elastic modulus and fracture energy. **Conclusions** There exists a significantly negative structure-activity relationship between the morphology of brain tissues and biomechanical properties. The limit load of postmortem brain tissues in 60 h is the optimum in

收稿日期:2016-10-07; 修回日期:2016-11-24

基金项目:国家自然科学基金项目(81072508), “十二五”国家科技支撑计划项目子课题(2012BAK02B02)。

通信作者:于晓军,教授,主任法医师, E-mail: xjyu@stu.edu.cn。

the window period, which can be used as a new method for estimating PMI.

Key words: Forensic pathology; Postmortem interval (PMI); Brain tissue; Biomechanics; Structure-activity relationship

死亡时间 (postmortem interval, PMI) 对于死亡案件的侦查线索、范围、嫌疑人、案件性质、作案过程等问题均具有重要证据价值^[1]。已报道的推断 PMI 方法很多,如尸体现象、尸体化学、生物化学、昆虫学等^[2-3],几乎应用了各相关学科的新技术,但存在各自的局限性,很少有共识的实际应用。医学生物力学已有多年的研究历史和临床应用成果^[4],在法医学中亦有相关的研究和应用,包括:颅脑损伤、交通事故损伤等的成伤机制和致伤物推断,酗酒对血管壁组织生物力学特性的影响,利用人腹主动脉纵向拉伸的生物力学指标进行年龄推断等^[5-8]。本研究基于不可避免的尸体组织自溶腐败进行性破坏各器官组织形态结构的现象和理化构效关系的原理,认为这必然导致组织生物力学性状随 PMI 的时序性变化,探讨不同死后时间脑组织生物力学参数变化规律及其与 PMI 的相关性,用以推断 PMI 的可行性^[9-10]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

正规屠宰场放血处死的成年家猪,4月龄,体重120~150 kg,共42个全脑组织。

便携式生物力学检测仪(KDI-0.2,与深圳市凯强力科技有限公司合作研制,配置的拉压传感器适当,测力范围2~1 000 N,测力分辨率 $\pm 1/250\ 000$,测力精度 $\pm 1\%$,位移精度 $\pm 0.5\%$,变形精度 $\pm 0.5\%$,尤其适合经福尔马林液固定的生物组织力学测试,防止酸性福尔马林液对各种夹具的腐蚀),数字游标卡尺(深圳市新伯特电子有限公司),RXZ智能型人工气候箱(宁波江南仪器制造厂),自制专用可调固定间距的试件取材刀具。

1.2 方法

提取全脑组织后置于25℃恒温、75%恒湿人工气候箱内,保鲜薄膜覆盖,根据定时、定位、定向、定比、定量、定形“六定”规范冠状面切取脑组织。具体步骤如下:设计6个时间组(定时),分别为0、12、24、36、48、60 h;在左右大脑额叶上中部(定位),于

冠状面自表向里(定向)切取脑组织,确保脑组织皮质-白质比例1:1;按检材质量与固定-萃取液体积比1:10(定比)放入10%甲醛溶液固定3 d后,电子游标卡尺测量切取2.0 cm×1.5 cm×1.5 cm(定量)长方体(定型)脑组织试件,同时制作生物力学试件和组织切片。

常规HE染色和Glee嗜银染色组织切片,生物显微镜(Leica DM2000+DFC295,德国)观测脑组织形态学,病理图像量化分析软件IPP 6.0测算不同时间点Glee嗜银特殊染色脑组织间隙面积、累积光密度(integrated optical density, IOD)值等指标。

如图1所示,脑组织试件皮质面向上放置载物台,进行单向纵轴压缩测试,参数设置为测量误差0.1%、预载加力50 mN、运行速度10 mm/min、压缩变形厚达4 mm时自动停机,屏幕显示极限载荷(材料压缩到最大程度时所承受的极限载荷值,反映材料抵抗破坏和变化的能力,是材料性质的一个主要的总体检测指标)、应力(材料单位面积上的内力,反映材料强度和刚度,是比较不同材料之间的一个有意义指标)、应变(又称“相对变形”,物体由于外因如载荷、温度变化等,使它的几何形状和尺寸发生相对改变的物理量)、弹性模量(应力与应变的比值,即单位面积上承受的力)、平均力(材料被压缩过程中,若干时间点受力的平均值)、断裂能量(载荷-变形曲线下面积,即组织结构断裂所需能量)等。



图1 单向纵轴压缩测试

Fig. 1 One-way longitudinal compression test

1.3 数据统计

采用SPSS 16.0等软件进行统计分析,各组数据以均数 \pm 标准差表示,采用线性回归、单因素方差分析和两两比较(相邻时间组)等统计学分析方法。 $P < 0.05$ 表示显著性差异, $P < 0.01$ 表示高度显著性差异。

2 结果

2.1 形态学观察

2.1.1 大体观察 随着 PMI 延长,脑组织从有一定的光泽、弹性、质软、无臭,逐步演变到无光泽、污秽、瘫软、发臭、腐败液渗出、泡沫样器官(见表 1)。

表 1 猪脑随 PMI 大体变化特征

Tab.1 General changes of brain tissues in pig with PMI

t_{PMI}/h	猪脑变化特征
0 ~ 12	表面有光泽、软脑膜血管清晰,质实、无臭味
24	略混浊、灰白色,软化有形、渗液增多,研磨较易,臭味逐渐明显
36	混浊、灰绿色,软化有形,研磨较易,臭味明显,密度减少,漂浮固定液中
48 ~ 60	灰黄色,组织肿胀、瘫软、臭味大、泡沫器官形成

2.1.2 组织学观察 HE 染色显示,随 PMI 延长,

脑白质神经纤维从纹理清晰逐渐模糊浅淡,间隙逐渐疏松增宽;神经元胞浆、胞核结构轮廓清晰,逐渐胞体肿胀→碎裂→溶解→消失,与间质融合神经纤维从结构致密、排列规则逐渐到排列紊乱,出现大小不一腐败气泡[见图 2(a)]。Glees 神经纤维染色显示,随 PMI 延长,脑组织神经纤维纹理结构清晰、致密规整,逐渐疏松紊乱,间隙增宽[见图 2(b)]。

2.1.3 量化组织病理学结果 图 3 所示为 Glees 神经纤维染色脑白质组织的显微体视学观测间隙总面积及其 IOD 值随 PMI 的变化趋势。0 ~ 48 h,间隙总面积及其 IOD 值随 PMI 延长呈时序性升高趋势,间隔 12 h 组间比较差异高度显著 ($P < 0.01$),与 PMI 相关回归方程分别为: $y = 1.115x + 13.21$; $y = 2.61x + 28.01$ 。校正决定系数(adjust R^2)分别为 0.965 3、0.961 6,提示推断死亡时间“窗口期”,其余参数无统计意义。

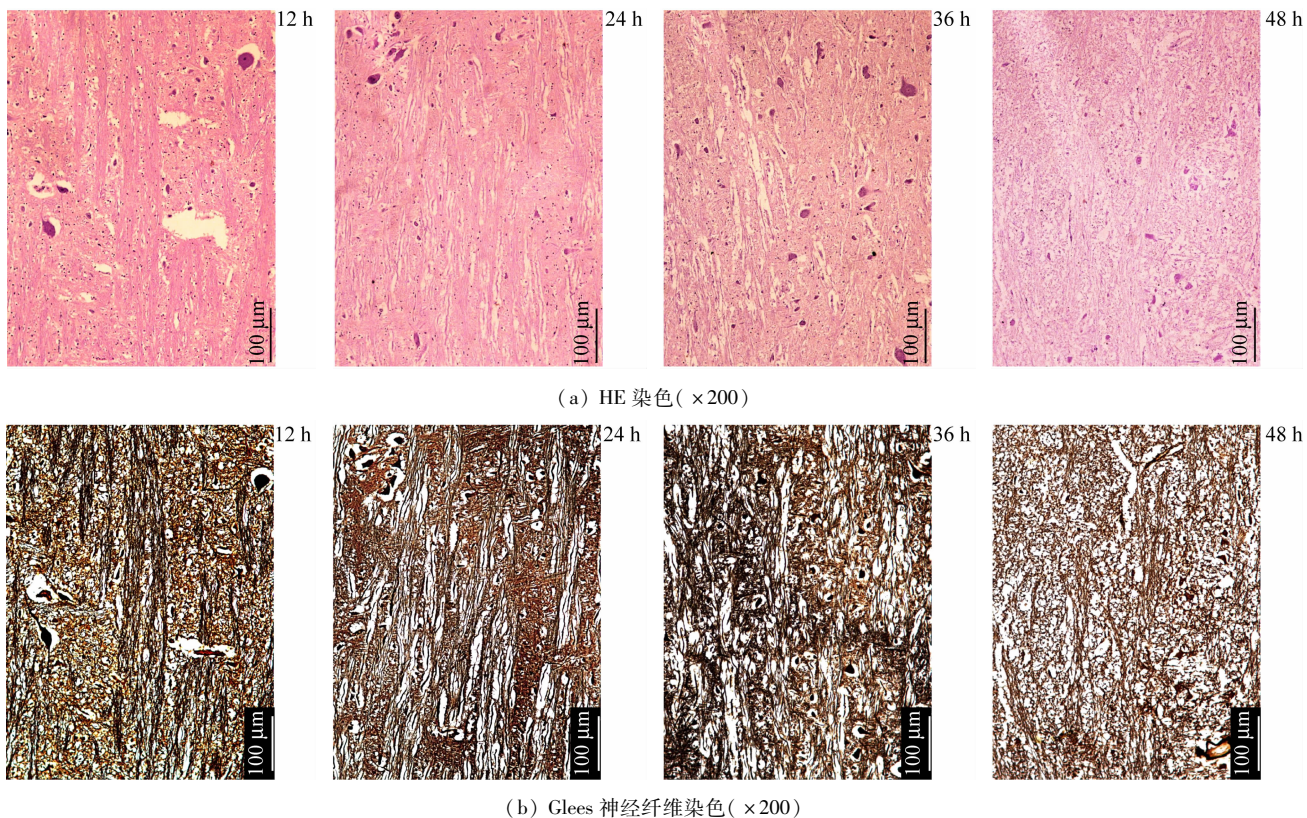


图 2 家猪不同死亡时间的脑白质组织学变化

Fig.2 Histopathological changes of white matter in pig brain at the different PMI (a) Hematoxylin-eosin staining($\times 200$), (b) Glees nerve fiber staining($\times 200$)

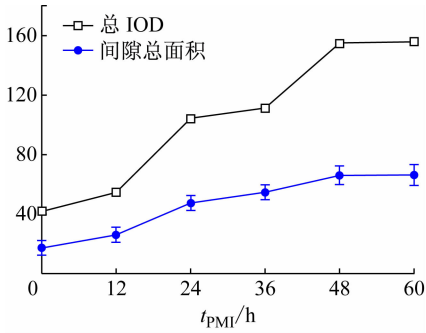


图3 脑白质间隙总面积和总 IOD 随 PMI 变化趋势
Fig.3 Variation trend of collagenous fiber area and IOD along with PMI

2.2 生物力学特性参数

由表 2 可知,各时间组脑组织的压缩极限载荷、平均力、弹性模量、断裂能量参数,均随 PMI 呈时序

表 2 脑组织的生物力学特性与 PMI 关系统计

Tab.2 Correlated statistics between biomechanical properties of brain tissues and PMI

t_{PMI}/h	极限载荷/N	平均力/N	弹性模量/MPa	断裂能量/(N·mm)
0	18.81 ± 1.25	6.91 ± 0.29	83.22 ± 8.63	22.30 ± 7.20
12	18.68 ± 1.74	6.54 ± 1.52	68.16 ± 15.21	20.98 ± 6.91
24	11.21 ± 1.54 **	4.58 ± 0.42 **	41.52 ± 4.58 **	16.14 ± 4.83 **
36	9.72 ± 1.26 *	4.24 ± 0.70	40.91 ± 4.98	14.65 ± 4.92 *
48	4.87 ± 0.64 **	2.62 ± 0.73 **	24.94 ± 7.67 **	9.32 ± 4.90 **
60	2.12 ± 0.57 **	0.96 ± 0.26 *	8.98 ± 2.11 **	3.69 ± 2.11 **

注: * 表示间隔 12 h 组间 $P < 0.05$, ** 表示间隔 12 h 组间 $P < 0.01$

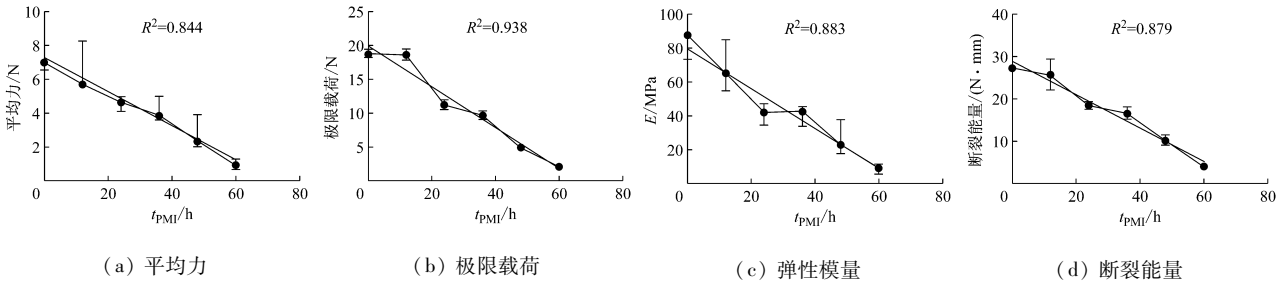


图 4 死后脑组织各项生物力学参数和 PMI 的线性回归方程图

Fig.4 Regression equation between biomechanical parameters and PMI in brain tissues after death (a) Average force, (b) Limit load, (c) Elastic modulus, (d) Fracture energy.

3 讨论

本文基于生物软组织具有各向异性黏弹性和非

性降低趋势。同一时间点各参数均符合总体方差齐性,服从正态分布。0 ~ 12 h 呈平缓“前平台期”, 12 ~ 60 h 呈明显下降趋势, 总体比较差异显著 ($P < 0.05$)。其中,极限载荷的各组间比较呈高度显著性差异 ($P < 0.01$)。

如图 4 所示,死后 12 ~ 60 h 脑组织的各项生物力学参数,以时间为因变量,以极限载荷、平均力、弹性模量、断裂能量为自变量的线性回归方程分别为:

$$Y_{PMI} = -1.206x_{\text{极限载荷}} + 81.724$$

$$Y_{PMI} = -8.289x_{\text{平均力}} + 67.003$$

$$Y_{PMI} = -0.616x_{\text{弹性模量}} + 57.098$$

$$Y_{PMI} = -2.092x_{\text{断裂能量}} + 66.970$$

校正系数 (adjust R^2) 分别为 0.938、0.884、0.883、0.879。估计标准误差分别为 ± 4.805 、 ± 6.350 、 ± 7.575 、 ± 6.492 。

均质性,不同器官或同一器官不同部位存在差异性的特点^[11],以及尸体组织随死后时间增长而自溶腐败的过程中,其生物力学性状发生变化的构效关系

原理,运用甲醛固定脑组织和生物力学检测技术,研究家猪死后脑组织生物力学特性时序性变化规律,探讨其与 PMI 的关系。

脑组织位于封闭颅腔内,与外界隔离,死后不易受环境因素影响,故脑组织的死后组织形态结构及其生物力学特性变化,与其他脏器比较,必然存在其“特殊”、“稳定”的时序性变化;额叶部位受无重要功能区,在成长的过程中后天影响因素少,组织结构相对均一,压缩受力均匀,便于标准化取材。因此,选取家猪脑组织额叶作为实验对象,而脑生物力学特性用于推断 PMI 的研究鲜有报道。

由于脑组织物质成分丰富、水分含量高等特点,导致其有自溶腐败快的特点,故死后 24 h 脑组织已开始瘫软,腐败液明显增多,组织形状不规则,难于进行生物力学测试。为了提高脑组织生物力学特性检测时限,采用甲醛固定。通过固定液使蛋白质变性、凝固和交联的作用,可以灭活组织细胞中的自溶酶和腐败菌,以防止检测试件的继续自溶腐败并延长其检测时限;固定完全的组织结构稳定,韧性和硬度均明显提高,减少了生物软组织的应力松弛、蠕变和弹性滞后等特征^[12-13],不需要新鲜软组织测试时的预调操作,简化检测程序和精度;便于同时同步取材,制备常规 HE 组织切片,保证构效关系分析的相关性和一致性。因为所有试件均采用甲醛固定,且时间、浓度及质量均相同,同时提高生物力学效应,检测结果仍有可比性。

尸体现象及组织形态学定性等研究已经证明其时序性变化与 PMI 呈一定的相关性^[14]。通过大体肉眼观察到随着 PMI(0 ~ 60 h) 延长,家猪脑组织色泽、质地、HE 染色和 Glees 神经纤维染色相关指标均呈时序性变化,但是形态学观察缺乏客观量化性评价指标,易受主观经验和语言表述等影响,仅只能作为参考。采用计算机图像处理技术量化分析组织形态学改变已经成为量化病理学研究和诊断的热点,应用范围极广、意义深远。在法医学上,有关通过图像分析处理方法量化探讨尸体组织器官各种形态学指标变化以推断 PMI 的研究已有报道^[15]。本实验采用彩色病理图像分析脑组织间隙总面积及其 IOD,证实了死后 0 ~ 48 h 与 PMI 呈正相关,为脑组织推断 PMI“窗口期”。但是,该方法存在缺乏观测指标的规范化和标准化问题。鉴于不同实验室或制

片批次的切片厚度、染色深浅、显微照相条件,以及视野选择等因素可存在一定差异,采用图像分析软件 IPP 分析时,应选定同一色调-饱和度-强度值(hue-saturation-intensity, HSI),以减少人为因素,获得客观、准确的可重复性结果。本实验以此为基础与生物力学相结合,系统分析 PMI。生物力学应用于 PMI 的研究很少报道,理论上,脑组织形态学上组织间隙逐渐增加的结构变化应为其生物力学特性效能下降的基础。压缩实验证实家猪脑组织试件的极限载荷、平均力、弹性模量、断裂能量等生物力学性状参数,死后 12 ~ 60 h 与 PMI 均呈负相关,为 PMI 窗口期。其中,以极限载荷相关性最高,提示极限载荷指标的精确度和准确度优于平均力、弹性模量、断裂能量等指标,推测极限载荷是直接反映组织的生物力学特性指标,受组织各向异性、黏弹性影响小的缘故。

综上所述,本研究结果证实尸体脑组织的极限载荷、平均力、弹性模量、断裂能量的生物力学性状指标变化,与自溶腐败所致的组织结构变化之间存在明显的时序性构效关系。生物力学性状检测可获得量化数值,有效避免大体形态观测的主观随意性。同时,制定了组织生物力学试件的“六定”取材和备制规范,可获得重复性结果。因此,结合组织形态学与生物力学检测,可作为推断 PMI 一种简便易行、客观量化的方法。本研究属于恒温、恒湿条件下的家猪动物实验,需进一步考虑环境温度、性别、年龄、死因等相关因素对尸体组织自溶腐败及其生物力学性状的影响,并通过人尸体组织开展研究验证。

参考文献:

- [1] 吴家驹. 法医学[M]. 3 版. 成都:四川大学出版社, 2008: 33-55.
 - [2] 黎增强, 左卫东, 张付, 等. 死亡时间推断研究进展[J]. 法医学杂志, 2012, 28(4): 287-292.
 - [3] HENßGE C, MADEA B. Estimation of the time since death in the early postmortem period [J]. Forensic Sci Int, 2004, 144(2-3): 167-175.
 - [4] 许燕, 樊瑜波, 于晓军, 等. 法医生物力学研究进展[J]. 生物医学工程学杂志, 2004, 21(1): 141-145.
 - [5] 赵玮, 阮世捷, 李海岩, 等. 脑组织车构模型及其生物力学特性分析[J]. 医用生物力学, 2014, 29(1): 85-92.
- ZHAO W, RUAN SJ, LI HY, et al. Analysis on constitutive

- models and biomechanical properties of brain [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(1): 85-92.
- [6] 羊玢, 曹立波, 陈宁, 等. 颅脑有限元模型演化规律及其生物力学研究进展[J]. *医用生物力学*, 2014, 29(6): 576-588.
 YANG B, CAO LB, CHEN N, *et al*. Advance in evolution and biomechanical mechanism for finite element model of human brain [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(6): 576-588.
- [7] WANG HP, YU XJ, XU GH, *et al*. Alcoholism and traumatic subarachnoid hemorrhage: An experimental study on vascular morphology and biomechanics [J]. *Trauma*, 2011, 70(1): E6-E12.
- [8] HORNY L, ADAMEK T, VESELY J, *et al*. Age-related distribution of longitudinal pre-strain in abdominal aorta with emphasis on forensic application [J]. *Forensic Sci Int*, 2012, 214(1-3): 18-22.
- [9] HORNY L, ADAMEK T, KULVAJTOVA M. Analysis of axial prestretch in the abdominal aorta with reference to post mortem interval and degree of atherosclerosis [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2014, 33: 93-98.
- [10] 石学志, 杨含金, 于晓军, 等. 利用猪胸主动脉生物力学性能时序性变化推断死亡时间[J]. *中国法医学杂志*, 2013, 28(2): 108-111.
- [11] 杨桂通. *医用生物力学*[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [12] SPARKS JL, DUPAIX RB. Constitutive modeling of rate-dependent stress-strain behavior of human liver in blunt impact loading [J]. *Ann Biomed Eng*, 2008, 36(11): 1883-1892.
- [13] KEMPER AR, SANTAGO AC, STITZEL JD, *et al*. Biomechanical response of liver in tensile loading [J]. *Ann Adv Automot Med*, 2010, 54: 15-26.
- [14] SWANN LM, FORBES SL, LEWIS SW. Analytical separations of mammalian decomposition products for forensic science: A review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 682: 9-22.
- [15] 张惠芹, 苗国华, 李宾斯. 图像分析处理技术在法医学中的应用[J]. *中国人民公安大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(1): 26-29.

《医用生物力学》杂志征稿启事

《医用生物力学》杂志由中华人民共和国教育部主管、上海交通大学主办,是国内唯一一本公开发行,以积极反映生物力学基础研究与应用研究成果,推动国内外学术交流,促进医、生、理、工各学科相互了解和合作为目的的学术性刊物。报道内容主要包括生物力学领域中有关力学生物学、器官-组织生物力学、细胞-亚细胞-分子生物力学、感觉系统生物力学、骨骼肌肉系统生物力学、航空航天生物力学、颌面口腔生物力学、呼吸系统生物力学、康复工程生物力学、心血管系统生物力学、血液流变学、医用材料生物力学、运动医学生物力学等的研究论文。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊);美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、荷兰《文摘与引文数据库》来源期刊;2015年入选北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2014年版)。

本刊为双月刊,每双月25日出版,16开本,96页,国内统一连续出版物号CN 31-1624/R,国际标准连续出版物号ISSN 1004-7220;定价每期15.00元,全年90.00元,本刊欢迎有关生物力学基础和临床研究的论著、文献综述。除中文稿体外,也欢迎具有创新性的英文稿件。欢迎广大作者踊跃来稿。

地址:上海市制造局路639号200011

电话:(021)53315397;传真:(021)63137020;电子信箱:shengwulixue@163.com

网址:www.medbiomechanics.com, www.mechanobiology.cn