

·论 著·

混合效应模型在玻璃体液推断死亡时间中的应用

杨明真¹,李辉军²,张天叶³,丁自娇¹,吴士凡¹,邱鑫罡¹,刘 茜¹

(1. 华中科技大学同济医学院法医学系,湖北 武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科,湖北 武汉 430030; 3. 上海市公安局物证鉴定中心 上海市现场物证重点实验室,上海 200083)

摘要:目的 通过检测不同温度下家兔尸体玻璃体内 K^+ 、 Mg^{2+} 浓度随 PMI 的变化规律,探索应用混合效应模型推断死亡时间(postmortem interval, PMI)的可行性。方法 家兔处死后分别置于 5℃、15℃、25℃ 和 35℃ 温度下保存,在 0~120 h 内每 12 h 双眼交替微量提取玻璃体液 80~100 μ L。应用生化免疫分析仪检测玻璃体液中 K^+ 、 Mg^{2+} 的浓度。应用混合效应模型进行分析拟合,建立 PMI 推断方程。使用放置于 10℃、20℃、30℃ 温度下均经过 20、40、65 h 的样本检测数据对 PMI 推断方程进行验证。结果 各温度(y)下家兔玻璃体液中 K^+ 、 Mg^{2+} 浓度 [$f(x, y)$] 随 PMI(x) 延长均呈上升趋势。在 5℃~35℃, PMI 及温度拟合的 K^+ 、 Mg^{2+} 浓度方程分别为: $f_{K^+}(x, y) = 3.413 0 + 0.309 2 x + 0.337 6 y + 0.010 83 xy - 0.002 47 x^2$ ($P < 0.000 1$); $f_{Mg^{2+}}(x, y) = 0.745 6 + 0.006 432 x + 0.033 8 y$ ($P < 0.000 1$)。经验证, PMI 为 0~40 h 时, K^+ 、 Mg^{2+} 浓度推断 PMI 的偏离时间均在 10 h 以内; PMI 为 40~65 h 时, 偏离时间在 21 h 以内。结论 在 5℃~35℃ 的环境温度区间内, 利用混合效应模型拟合的方法可实现利用温度和玻璃体液物质浓度双参数推断 PMI, 将为解决玻璃体液化学物质在 PMI 推断中的实际应用提供新方法。

关键词: 法医病理学; 玻璃体; 死亡时间; 体液; 混合效应模型; 钾; 镁

中图分类号: DF795.1 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2018.01.003

文章编号: 1004-5619(2018)01-0013-05

Application of Mixed-effect Model in PMI Estimation by Vitreous Humor

YANG Ming-zhen¹, LI Hui-jun², ZHANG Tian-ye³, DING Zi-jiao¹, WU Shi-fan¹, QIU Xin-gang¹, LIU Qian¹
(1. Department of Forensic Medicine, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Clinical Lab, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Crime Scene Evidence, Institute of Forensic Science, Shanghai Public Security Bureau, Shanghai 200083, China)

Abstract: **Objective** To test the changes of the potassium (K^+) and magnesium (Mg^{2+}) concentrations in vitreous humor of rabbits along with postmortem interval (PMI) under different temperatures, and explore the feasibility of PMI estimation using mixed-effect model. **Methods** After sacrifice, rabbit carcasses were preserved at 5℃, 15℃, 25℃ and 35℃, and 80–100 μ L of vitreous humor was collected by the double-eye alternating micro-sampling method at every 12 h. The concentrations of K^+ and Mg^{2+} in vitreous humor were measured by a biochemical-immune analyser. The mixed-effect model was used to perform analysis and fitting, and established the equations for PMI estimation. The data detected from the samples that were stoned at 10℃, 20℃ and 30℃ with 20, 40 and 65 h were used to validate the equations of PMI estimation. **Results** The concentrations of K^+ and Mg^{2+} [$f(x, y)$] in vitreous humor of rabbits under different temperature increased along with PMI (x). The relative equations of K^+ and Mg^{2+} concentration with PMI and temperature under 5℃~35℃ were $f_{K^+}(x, y) = 3.413 0 + 0.309 2 x + 0.337 6 y + 0.010 83 xy - 0.002 47 x^2$ ($P < 0.000 1$), and $f_{Mg^{2+}}(x, y) = 0.745 6 + 0.006 432 x + 0.033 8 y$ ($P < 0.000 1$), respectively. It was proved that the time of deviation for PMI estimation by K^+ and Mg^{2+} was in 10 h when PMI was between 0 to 40 h, and the time of deviation was in 21 h when PMI was between 40 to 65 h. **Conclusion** In the ambient temperature range of 5℃–35℃, the mixed-effect model based on temperature and vitreous humor substance concentrations can provide a new method for the practical application of vitreous humor chemicals for PMI estimation.

Keywords: forensic pathology; vitreous body; postmortem interval; body fluids; mixed-effect model; potassium; magnesium

死亡时间(postmortem interval, PMI)推断对刑事死亡案件及自然死亡均具有重要的意义,是法医学者

基金项目: 证据科学教育部重点实验室(中国政法大学)开放基金资助项目(2014KFKT06); 中央高校基本科研业务费资助项目(HUST:2015TS003)

作者简介: 杨明真(1990—),女,硕士研究生,主要从事法医病理学和法医毒理学研究与鉴定; E-mail: yangmingzhen90@126.com

通信作者: 刘茜,女,副教授,博士,主要从事法医病理学和法医毒理学研究; E-mail: caixe_liu0222@tom.com

面临的最具挑战性的问题之一^[1]。在法医学实践中, PMI推断受诸多因素的影响,在所有影响 PMI推断的因素中,以环境温度的影响最大^[2]。玻璃体液(vitreous humor, VH)用于推断 PMI研究已有 50 余年,很多学者应用新方法检测 VH 中各种物质浓度,并建立了 PMI 的推导方程,使 VH 推断 PMI 的研究不断深入^[2-6]。随着生化检测技术不断发展,更多的拟合方法和数学模型用于 PMI 推断,为解决 PMI 推断中的难题提供了

新思路。

本课题组早期证实了 VH 内 K^+ 、 Mg^{2+} 与 PMI 具有强相关性^[7], 本研究就不同温度条件影响 PMI 推断的问题进行观察, 在以 VH 中 K^+ 、 Mg^{2+} 浓度和 PMI 为变量基础上, 引入环境温度变量, 应用混合效应模型的理论和方法, 探讨在一定外界环境温度 (5℃~35℃) 内, 家兔眼 VH 中 K^+ 、 Mg^{2+} 浓度的死后变化与 PMI 的关系, 建立一种可应用于不同外界环境温度条件下的 PMI 推断方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年家兔 58 只 (华中科技大学同济医学院实验动物中心提供), 雌雄不限, 体质量 1 600~2 500 g, 其中 40 只按随机原则分为 5℃、15℃、25℃、35℃ 四个实验组, 每组 10 只。家兔以耳缘静脉空气栓塞法处死, 分别置于 CTHI-100 恒温恒湿箱 [施都凯仪器设备 (上海) 有限公司] 5℃、15℃、25℃、35℃ 环境下, 温度波动度 ± 1.0 ℃, 湿度范围 25%~70%。其余 18 只按随机原则分为 10℃、20℃、30℃ 三个验证组, 每组 6 只, 以上述方法处死后分别置于 10℃、20℃、30℃ 的恒温恒湿箱内。

1.2 取样

采用刘茜等^[7]报道的双眼交替微量取样方法, 对实验组各组家兔进行双眼交替微量取样, 左眼于死后 0、24、48、72、96、120 h, 右眼于死后 12、36、60、84、108 h, 分别取 VH 80~100 μ L。验证组于死后 20、40、65 h 分别取 VH 80~100 μ L。舍弃浑浊或混有血液的样本, 合格样本于微量离心管中 -80℃ 保存, 2 周内检

测。高温环境 (25℃、35℃) 下, 因腐败速度快, 取材仅持续至死后 72 h。

1.3 样本检测与统计分析

室温解冻后, 取 60 μ L 样本于检测瓶内, 按 $V_{\text{样本}}:V_{\text{去离子水}}=1:4$ 对样本进行稀释, 应用 Cobas® c701 罗氏生化免疫分析仪 [罗氏诊断产品 (上海) 有限公司] 检测实验组 VH 中 K^+ 、 Mg^{2+} 的浓度。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 观察 K^+ 、 Mg^{2+} 浓度的变化趋势。应用 SAS 9.3 软件进行混合效应模型的数值分析, 并以 PMI 为自变量 x , 温度为自变量 y , 各离子浓度为因变量 $f(x, y)$ 拟合方程。检验水准 $\alpha=0.000 1$ 。

1.4 验证组验证

将各验证组 VH 中 K^+ 、 Mg^{2+} 检测值分别带入相应方程内, 应用 Excel 2010 计算 PMI 值。将推测的 PMI 值与实际值相减得到残差, 计算同一时间点上的 6 个残差绝对值的均值得到各时间点的平均偏离时间。平均偏离时间与对应的 PMI 相比得到各时间点推测的平均偏离率。

2 结 果

2.1 样本检测结果

各组 K^+ 、 Mg^{2+} 浓度随 PMI 延长呈上升趋势, 各组 K^+ 浓度检测值见表 1, Mg^{2+} 浓度检测值见表 2。由于高温 (25℃ 和 35℃) 条件下, 玻璃体腐败加快, 至 72 h 后已无法提取 VH。

2.2 混合效应模型拟合结果

经混合效应模型拟合后, K^+ 、 Mg^{2+} 浓度的固定效应参数估计与比较及三种固定效应假设检验的结果见表 3~4。

表 1 不同温度下家兔 VH 中 K^+ 浓度检测结果

PMI/h	$(\bar{x} \pm s, \text{mmol/L})$			
	5℃ (n=10)	15℃ (n=10)	25℃ (n=10)	35℃ (n=10)
0	9.39 \pm 0.44	9.49 \pm 0.26	9.55 \pm 0.42	9.38 \pm 0.18
12	10.91 \pm 0.92	10.81 \pm 0.65	17.03 \pm 1.06	20.77 \pm 0.84
24	14.12 \pm 0.99	16.14 \pm 0.84	27.99 \pm 1.41	37.37 \pm 2.08
36	17.47 \pm 0.93	19.53 \pm 0.95	36.34 \pm 2.53	44.13 \pm 1.92
48	19.33 \pm 1.40	26.05 \pm 1.29	44.65 \pm 1.71	52.41 \pm 2.46
60	22.14 \pm 0.89	30.07 \pm 0.70	46.61 \pm 2.68	58.52 \pm 2.42
72	24.20 \pm 0.92	33.64 \pm 0.67	46.33 \pm 2.09	60.48 \pm 1.36
84	25.98 \pm 0.99	34.03 \pm 1.24	—	—
96	27.90 \pm 1.34	38.00 \pm 1.72	—	—
108	29.14 \pm 1.20	38.15 \pm 1.50	—	—
120	28.34 \pm 1.57	40.55 \pm 1.79	—	—

注: “—” 为缺失值

表 2 不同温度下家兔 VH 中 Mg^{2+} 浓度检测结果

PMI/h	$(\bar{x} \pm s, \text{mmol/L})$			
	5 °C ($n=10$)	15 °C ($n=10$)	25 °C ($n=10$)	35 °C ($n=10$)
0	1.01±0.04	0.98±0.05	0.91±0.05	1.00±0.05
12	0.86±0.04	1.00±0.10	1.22±0.06	1.38±0.08
24	0.95±0.09	1.17±0.03	1.72±0.11	2.26±0.08
36	1.03±0.05	1.27±0.06	2.37±0.10	2.67±0.12
48	1.11±0.05	1.60±0.07	2.80±0.05	3.09±0.09
60	1.20±0.05	1.76±0.13	2.92±0.13	3.27±0.06
72	1.34±0.07	1.94±0.08	3.05±0.12	3.34±0.07
84	1.55±0.06	1.86±0.14	—	—
96	1.73±0.05	2.00±0.08	—	—
108	1.80±0.07	1.97±0.10	—	—
120	1.88±0.07	1.84±0.09	—	—

注:“—”为缺失值

表 3 固定效应的参数估计与比较

效应	K^{+} 浓度					Mg^{2+} 浓度				
	参数估计	误差	自由度	t	P	参数估计	误差	自由度	t	P
截距	3.413 0	0.863 1	38	3.95	0.000 3	0.745 6	0.032 9	38	22.66	<0.000 1
PMI	0.390 2	0.031 6	317	12.35	<0.000 1	0.006 4	0.000 3	319	23.31	<0.000 1
T	0.337 6	0.032 7	38	10.32	<0.000 1	0.033 8	0.001 3	38	26.34	<0.000 1
PMI×T	0.010 8	0.000 5	317	20.67	<0.000 1	—	—	—	—	—
PMI×PMI	-0.002 5	0.000 2	317	-10.04	<0.000 1	—	—	—	—	—

注:T 表示温度;“—”表示交互无意义

表 4 三种固定效应的检验结果

效应	K^{+} 浓度				Mg^{2+} 浓度			
	分子自由度	分母自由度	F	P	分子自由度	分母自由度	F	P
PMI	1	317	152.62	<0.000 1	1	319	543.21	<0.000 1
T	1	38	105.56	<0.000 1	1	38	693.82	<0.000 1
PMI×T	1	317	427.35	<0.000 1	—	—	—	—
PMI×PMI	1	317	100.80	<0.000 1	—	—	—	—

注:T 表示温度;“—”表示交互无意义

由表 3 可知, K^{+} 、 Mg^{2+} 浓度的处理效应 PMI 和温度均具有统计学意义($P<0.000 1$)。由表 4 可知, K^{+} 不同温度之间的区别有统计学意义($P<0.000 1$),PMI、PMI×T 及 PMI×PMI 的交互作用有统计学意义($P<0.000 1$); Mg^{2+} 不同温度之间的区别有统计学意义($P<0.000 1$),PMI×T、PMI×PMI 的交互效应无意义,因此在模型拟合时未进行相应的交互拟合。经模型拟合后得到以 PMI 为自变量 x ,温度为自变量 y ,各离子浓度为因变量 $f(x,y)$ 的方程。 K^{+} 浓度的拟合方程为:

$$f_{K^{+}}(x,y)=3.413\ 0+0.309\ 2x+0.337\ 6y+0.010\ 83xy-$$

$$0.002\ 47x^2(P<0.000\ 1); \tag{1}$$

Mg^{2+} 浓度的拟合方程为:

$$f_{Mg^{2+}}(x,y)=0.745\ 6+0.006\ 432x+0.033\ 8y(P<0.000\ 1)。 \tag{2}$$

2.3 验证组验证结果

将验证组温度和 VH 中 K^{+} 、 Mg^{2+} 浓度检测值分别带入相应方程内,计算 PMI 值、平均偏离时间和平均偏离率(表 5)。PMI 为 0~40 h 时, K^{+} 、 Mg^{2+} 浓度推断 PMI 的偏离时间均在 10 h 以内;PMI 为 40~65 h 时, K^{+} 、 Mg^{2+} 浓度推断 PMI 的偏离时间在 21 h 以内。

表 5 混合效应模型拟合方程推断 PMI 的预测平均偏离率 (n=6)

PMI/h	温度/℃	K ⁺ 浓度			Mg ²⁺ 浓度		
		浓度均值/(mmol·L ⁻¹)	平均偏离率/%	平均偏离时间/h	浓度均值/(mmol·L ⁻¹)	平均偏离率/%	平均偏离时间/h
20	10	13.20	14.59	2.92	1.19	12.78	3.46
	20	18.76	10.79	2.16	1.53	15.73	3.15
	30	24.43	16.61	3.32	1.86	20.20	4.39
40	10	18.42	12.05	4.82	1.31	12.00	4.80
	20	25.31	14.14	5.66	1.65	11.23	4.49
	30	38.28	19.95	7.98	1.98	14.34	5.73
65	10	24.32	19.69	12.80	1.56	13.95	9.07
	20	36.23	20.89	13.58	1.91	16.81	10.93
	30	48.68	24.50	15.93	2.21	31.65	20.57

3 讨 论

VH 位于眼球后部的玻璃体内,玻璃体由于其特殊的解剖位置,与其他组织相对隔离,又受周围眼眶的保护,因此不易受到破坏,VH 相对血液、脑脊液、心包积液、滑膜液等其他体液具有死后变化缓慢且规律性较强,在死亡早期以及后期均受污染较少等特点,因此一直是法医病理学用于 PMI 推断研究和死后化学物质分析的研究热点^[8]。

VH 中物质浓度的死后变化受多种内因及外因的影响,其中环境温度的影响最显著^[9]。SCHONING 等^[10]研究发现,狗眼 VH 内 K⁺浓度随温度的上升及 PMI 的延长而增加,钠、氯、尿素氮在 4℃环境下的 48 h 内保持稳定,在 20℃、37℃环境下难以稳定。MCLAUGHLIN 等^[8]在 4℃、20℃、37℃温度条件下研究 120 头牛和 120 头猪血清和眼 VH,发现 K⁺和 P 的浓度随 PMI 延长和温度的上升而增加。王伟平等^[11]检测家兔死后在不同的环境温度下 VH 胆碱酯酶和谷草转氨酶的失活情况,结果表明,两种酶的活性改变在一定时间内各出现一个平台期,平台期后两种酶的活性迅速下降,低温度组在死后 54 h 后几乎为零,而在高温度组 48 h 后就已经几乎为零。ZILG 等^[12]报道,尸体所在的环境温度对死后 VH 内 K⁺浓度的影响占 5%。ROGNUM 等^[13]证实,VH 内 K⁺、HX 浓度推断 PMI 的拟合曲线随温度的增加其斜率增加。陶涛等^[14]认为,Mg²⁺浓度随 PMI 的延长而升高。龚志强等^[15]认为,48 h 内 Mg²⁺浓度与 PMI 相关性强,随 PMI 的延长而逐渐升高,可用于 48 h 内的 PMI 推断。刘茜等^[7]应用双眼交替微量取样法研究家兔 VH 内 Mg²⁺浓度的变化,发现家兔死后眼 VH 中 Mg²⁺浓度变化与时间呈强相关性,并随时间延长而升高。

以往运用 VH 中离子浓度变化推断 PMI 的研究^[7,15-18]多考虑 VH 离子浓度死后变化和 PMI 两种变量,并在此基础上推导出线性回归方程、二元二次或

多次方程,而未考虑外界环境温度的影响,因此在实际应用中有很大的局限性。混合效应模型,即所拟合的模型中既包含固定效应又包含随机效应,固定效应类似于标准回归系数,可直接估计得到,随机效应不是直接估计,而是来自方差和协方差估计。此模型可用于重复测量数据,即对同一个观察对象在不同时间点上进行的多次测量。由于重复测量数据是对同一对象的重复观测,同一受试者的观察数据间可能存在相关性,一些传统的统计学方法难以充分揭示这一内在特点。混合效应模型既考虑了观察对象在不同观察时间点的内在联系,又考虑了观察值间的内部相关性,其拟合方程更为可靠。本研究即对某一观察指标进行重复观察,以 VH 物质浓度为因变量,温度及 PMI 为固定效应进行模型拟合,所得结果证实,外界环境温度对物质的死后变化具有较大的影响作用,各温度组 K⁺、Mg²⁺浓度随 PMI 延长均呈上升趋势,与以上各研究^[7,15-18]保持一致性,但各个温度下的变化趋势明显不同,低温组变化平缓,而高温组变化剧烈,说明仅以物质的死后变化与 PMI 的关系,而不考虑外界环境温度的影响进行 PMI 推断,结果会存在相当大的误差。

本研究验证结果显示,K⁺、Mg²⁺浓度推断 PMI 的效果均较好,混合效应模型可应用于 PMI 的推断。在 PMI 为 0~40 h 时,K⁺、Mg²⁺浓度推断 PMI 的偏离时间均在 10 h 以内;当 PMI 为 40~65 h 时,K⁺、Mg²⁺浓度推断 PMI 的偏离时间在 21 h 以内。由于本研究中高温度(25℃、35℃)腐败较快,取材仅持续到 72 h,虽最终不影响数据拟合的完成,但拟合精度会有所下降,对后期验证有一定的局限性,因此在联合温度进行分析时,应合理选取研究时限,同时缩短取样时间间隔,增加温度分组,获得更多数据,以提高拟合方程的精度。

参考文献:

[1] PASSOS M L, SANTOS A M, PEREIRA A I, et al. Estimation of postmortem interval by hypoxanthine and potassium evaluation in vitreous humor with a

- sequential injection system[J]. *Talanta*, 2009, 79(4): 1094-1099.
- [2] HENSSGE C, MADEA B. Estimation of the time since death in the early post-mortem period[J]. *Forensic Sci Int*, 2004, 144(2-3): 167-175.
- [3] STURNER W Q, GANTNER G J. The postmortem interval. A study of potassium in the vitreous humor[J]. *Am J Clin Pathol*, 1964, 42: 137-144.
- [4] ZILG B, BERNARD S, ALKASS K, et al. A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature[J]. *Forensic Sci Int*, 2015, 254: 158-166.
- [5] ROGNUM T O, HOLMEN S, MUSSE M A, et al. Estimation of time since death by vitreous humor hypoxanthine, potassium, and ambient temperature[J]. *Forensic Sci Int*, 2016, 262: 160-165.
- [6] 韩顺琪, 秦志强, 邓恺飞, 等. 尸体化学的研究进展[J]. *法医学杂志*, 2015, 31(4): 287-292.
- [7] 刘茜, 武盛国, 汪岚, 等. 双眼交替微量取样检测兔玻璃体液钾镁离子浓度推测死亡时间[J]. *中国法医学杂志*, 2007, 22(1): 32-34, 38.
- [8] MCLAUGHLIN P S, MCLAUGHLIN B G. Chemical analysis of bovine and porcine vitreous humors: correlation of normal values with serum chemical values and changes with time and temperature[J]. *Am J Vet Res*, 1987, 48(3): 467-473.
- [9] HENSSGE C, MADEA B. Estimation of the time since death in the early post-mortem period[J]. *Forensic Sci Int*, 2004, 144(2): 167-175.
- [10] SCHONING P, STRAFUSS A C. Postmortem biochemical changes in canine vitreous humor[J]. *J Forensic Sci*, 1980, 25(1): 53-59.
- [11] 王伟平, 龙仁, 刘承良, 等. 家兔玻璃体液 CHE、AST 活性变化与 PMI 的相关性研究[J]. *美国中华临床医学杂志*, 2004, 6(1): 61-63.
- [12] ZILG B, BERNARD S, ALKASS K, et al. A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature[J]. *Forensic Sci Int*, 2015, 254: 158-166.
- [13] ROGNUM T O, HOLMEN S, MUSSE M A, et al. Estimation of time since death by vitreous humor hypoxanthine, potassium, and ambient temperature[J]. *Forensic Sci Int*, 2016, 262: 160-165.
- [14] 陶涛, 胥劲, 罗通行, 等. 人体死后不同时间玻璃体液化学成分的变化趋势[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2006, 37(6): 898-900, 927.
- [15] 龚志强, 曾宪斌, 孙跃刚, 等. 家兔眼玻璃体液 21 种元素含量与 PMI 关系的研究[J]. *法医学杂志*, 2002, 18(2): 67-69.
- [16] CHAUDHARY B, MEEL V, TIRPUDE B. Potassium concentration in vitreous humor in relation to time since death[J]. *Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 2007, 24(1): 26-30.
- [17] MADEA B, KREUSER C, BANASCHAK S. Post-mortem biochemical examination of synovial fluid--a preliminary study[J]. *Forensic Sci Int*, 2001, 118(1): 29-35.
- [18] JASHNANI K D, KALE S A, RUPANI A B. Vitreous humor: biochemical constituents in estimation of postmortem interval[J]. *J Forensic Sci*, 2010, 55(6): 1523-1527.

(收稿日期: 2017-03-22)

(本文编辑: 李正东)