

· 论 著 ·

· 水中尸体研究专题 ·

基于玻璃体液代谢物的水中大鼠淹没时间推断

张富源^{1,2}, 王林林^{1,2,3}, 张森^{1,2,3}, 董雯雯^{1,2,3}, 张忠铎^{1,2}, 李新杰^{1,2}, 马星宇^{1,2}, 杜书奎^{1,2}, 袁浩淼^{1,2}, 官大威^{1,2,3}, 赵锐^{1,2,3}

1. 中国医科大学法医学院 法医司法鉴定中心, 辽宁 沈阳 110122; 2. 智慧司法鉴定联合实验室, 辽宁 沈阳 110122; 3. 辽宁省法医学生物证据重点实验室, 辽宁 沈阳 110122

摘要:目的 采用LC-MS/MS代谢组学技术结合数据分析,检测水中大鼠尸体死后早期玻璃体液中代谢谱变化及差异,探讨其用于早期死后淹没时间(postmortem submersion interval, PMSI)和死亡原因推断的可行性。方法 于自然湖水中造模,将100只SD大鼠随机分为溺死组(50只)和死后[二氧化碳(CO₂)窒息]即刻入水组(50只),分别于死后0、6、12、18及24 h从每组中取10只大鼠提取玻璃体液进行代谢组学检测,其中8只构建训练集模型,2只作为测试集样本。通过PCA及PLS多元统计分析探索训练集样本中不同PMSI及死因间的代谢谱差异,进而应用随机森林(random forest, RF)算法筛选生物标志物并以此构建模型。结果 PCA及PLS分析可观察到玻璃体液代谢谱变化具有时间规律性,但不同死因间未发现明显差异。应用RF算法最终筛选到13种时间相关性较好的小分子生物标志物,基于该指标集构建了简化PMSI推断模型,测试数据表明模型预测的平均绝对误差为0.847 h。结论 水中大鼠尸体玻璃体液中筛选出的13种代谢标志物与早期死后淹没时间具有良好的时间相关性,应用RF构建的简化PMSI推断模型可用于PMSI的推断。此外,玻璃体液代谢物不能用于早期水中尸体的死因鉴别。

关键词: 法医病理学;代谢组学;死后淹没时间;玻璃体液;液相色谱-串联质谱;主成分分析;偏最小二乘法;大鼠

中图分类号: DF795.1 文献标志码: A doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2021.410613
文章编号: 1004-5619(2022)01-0059-08



Inferring Postmortem Submersion Interval in Rats Found in Water Based on Vitreous Humor Metabolites

ZHANG Fu-yuan^{1,2}, WANG Lin-lin^{1,2,3}, ZHANG Miao^{1,2,3}, DONG Wen-wen^{1,2,3}, ZHANG Zhong-duo^{1,2}, LI Xin-jie^{1,2}, MA Xing-yu^{1,2}, DU Shu-kui^{1,2}, YUAN Hao-miao^{1,2}, GUAN Da-wei^{1,2,3}, ZHAO Rui^{1,2,3}

1. Center of Medico-legal Investigation, School of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang 110122, China; 2. Collaborative Laboratory of Intelligentized Forensic Science, Shenyang 110122, China; 3. Liaoning Province Key Laboratory of Forensic Bio-evidence Science, Shenyang 110122, China

Abstract: **Objective** The metabolomics technique of LC-MS/MS combined with data analysis was used to detect changes and differences in metabolic profiles in the vitreous humor of early rat carcasses found in water, and to explore the feasibility of its use for early postmortem submersion interval (PMSI) estimation and the cause of death determination. **Methods** The experimental model was established in natural lake water with 100 SD rats were randomly divided into a drowning group ($n=50$) and a postmortem (CO₂ suffocation) immediately submersion group ($n=50$). Vitreous humor was extracted from 10 rats in each group at 0, 6, 12, 18 and 24 h postmortem for metabolomics analyses, of which 8 were used as the training set to build the model, and 2 were used as test set. PCA and PLS multivariate statistical analysis were performed to explore the differences in metabolic profiles among PMSI and causes of death in the training set samples. Then random forest (RF) algorithm was used to screen several biomarkers to establish a model. **Results** PCA and PLS analysis showed that the metabolic profiles had time regularity, but no differences were found among different causes of death. Thirteen small molecule biomarkers with good temporal correlation were selected by RF algorithm. A simple PMSI estimation model was constructed based on this indicator set, and the data of the test samples showed the mean absolute error (MAE) of the model was 0.847 h. **Conclusion** The 13 metabolic markers screened in the vitreous humor of rat corpses in water had good correlations with the early PMSI. The simplified PMSI estimation model constructed by RF can be used to estimate the PMSI. Additionally, the metabolic profiles of vitreous humor cannot be used for early identification of cause of death in water carcasses.

Keywords: forensic pathology; metabolomics; postmortem submersion interval; vitreous humor; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; principal components analysis; partial least square; rats

基金项目:国家重点研发计划资助项目(2018YFC0807204);国家自然科学基金资助项目(81801874,81971793,81871529);沈阳市中青年科技创新人才支持计划资助项目(RC200412)

作者简介:张富源(1995—),男,博士研究生,主要从事法医病理学研究;E-mail:137667006@qq.com

通信作者:赵锐,男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事法医病理学教学、科研和司法鉴定;E-mail:rzhaor@cmu.edu.cn

通信作者:官大威,男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事法医病理学教学、科研和司法鉴定;E-mail:dwguan@cmu.edu.cn

引用格式:张富源,王林林,张森,等.基于玻璃体液代谢物的水中大鼠淹没时间推断[J].法医学杂志,2022,38(1):59-66.

To cite:ZHANG F Y, WANG L L, ZHANG M, et al. Inferring postmortem submersion interval in rats found in water based on vitreous humor metabolites[J]. Fayixue Zazhi, 2022, 38(1): 59-66.

水中尸体的鉴定一直是法医工作中的重点及难点,实践中需要明确水中尸体的死亡时间(postmortem interval, PMI)以及死亡原因等问题。死后淹没时间(postmortem submersion interval, PMSI)是指水中尸体从入水到被发现所经历的时间^[1],与其PMI基本一致,常用于衡量水中尸体的死亡时间。有研究^[2-3]提出,采用腐败程度总评分(total aquatic decomposition score, TADS)结合累积日度(accumulated degree day, ADD)的方法推断水中尸体PMSI,但该方法易受主观因素影响,且不适用于早期水中尸体^[4-5]。另外,尽管硅藻检验被认为是诊断溺死的“金标准”,但其存在假阳性和假阴性^[6-7]。因此,建立或寻找具有较高准确性及特异性的方法或指标用于早期水中尸体PMSI推断及死因鉴别是亟须解决的法医病理学科学问题。

代谢组学是一个新兴的组学技术应用领域,专门检测机体在疾病或者外界刺激状态下体内组织或体液中小分子代谢物的变化情况^[8]。随着相应仪器性能的提高和代谢组学方法的发展,越来越多的学者认识到深入了解机体死后代谢过程的变化对于准确推断PMI的重要性^[9-11]。由于溺水过程涉及复杂的病理生理过程及机制^[12],而且机体在死亡后体内多种生化过程因缺氧而中断,代谢物发生不可逆的变化^[13]。从整体角度分析机体的代谢变化不仅有助于深入了解溺死的病理生理过程,而且对探索水中尸体死后代谢谱变化规律与淹没时间和死亡原因的关系具有重要意义。

近些年,国内外法医学者针对血液、玻璃体液、房水、脑脊液、心包液及滑膜液等进行了尸体死后代谢和生物化学研究^[14-18],其中玻璃体液由于解剖位置特殊,不易被破坏污染,是较为理想的研究检材^[19]。本研究拟建立大鼠溺死及死后即刻入水模型,通过LC-MS/MS代谢组学方法检测死亡早期水中大鼠尸体玻璃体液中的小分子代谢谱,运用多元统计分析及机器学习算法探索代谢物的变化规律及差异,以期为水中尸体早期PMSI推断及死因鉴别提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

Q Exactive™ HF-X 质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Vanquish™ Neo UHPLC 系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), Hypesil Gold™ C18 选择性 HPLC 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm; 美国 Thermo Fisher Scientific 公司), D3024R 低温离心机(美国 Scilogex 公司)。

甲醇(色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 水(色谱纯, 美国 Merck 公司), 甲酸(色谱纯, 美

国 Thermo Fisher Scientific 公司), 醋酸铵(色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 实验动物及分组

健康成年雄性 SD 大鼠 100 只, 体质量 230~270 g, 由中国医科大学实验动物部提供。将大鼠适应性饲养于温度(25±2)℃、相对湿度 45%~55%、光照/黑暗 12 h 交替的环境中, 自由进食饮水。饲养 1 周后进行实验, 实验地点为辽宁省沈阳市沈北新区冬雪湖(N41°963', E123°479'), 水体为淡水湖泊, 于夏季(6月)开展实验, 整个实验期间湖水温度为 20℃~25℃。本研究获得中国医科大学动物伦理学委员会审核批准(审批号 CMU2019242)。

将 SD 大鼠随机分为溺死组和死后即刻入水组, 每组 50 只。溺死组大鼠参照 WANG 等^[20]方法制作大鼠溺死模型, 将大鼠置于无菌网袋内, 按照自然湖水中淹没 1 min、水上呼吸 30 s 的步骤循环, 直至大鼠死亡, 死亡后将其置于自然湖水中淹没(约水下 0.5 m)。对死后即刻入水组大鼠采用二氧化碳(CO₂)气体窒息处死后浸入湖水相同水深处。于死后固定时间点 0、6、12、18 及 24 h, 在每组中提取 10 只大鼠的双侧眼球玻璃体液, 取材后立即将样本置于液氮中速冻, 随后于 -80℃ 保存备检。每组每个时间点内取 8 只大鼠的样本用于训练集模型构建, 2 只大鼠的样本作为测试集样本。其中死后即刻入水(0 h)组有 2 只大鼠玻璃体液取材失败, 本研究共 98 份玻璃体液样本。

1.3 样本处理

抽取 50 μL 玻璃体液样本置于微量离心管中, 加入 200 μL 质谱级甲醇沉淀蛋白, 涡旋振荡后冰浴静置 5 min, 于 4℃ 下, 15 000×g 离心 10 min。移取 100 μL 上清液至新的微量离心管中, 加入质谱级水稀释至甲醇含量为 53%, 并于 4℃ 下, 15 000×g 离心 10 min, 收集上清液, 上机进行分析。从每个实验样本中取等体积样本混匀作为质量控制(quality control, QC)样本, 用于平衡色谱-质谱系统和监测仪器状态, 在整个实验过程中对系统稳定性进行评价。以 53% 甲醇水溶液代替实验样本作为空白样本, 用于去除背景离子。QC 样本和空白样本处理过程与实验样本相同。

1.4 LC-MS/MS 检测

色谱条件: Hypesil Gold™ C18 选择性 HPLC 色谱柱, 柱温 40℃, 流速 0.2 mL/min。阳离子模式流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液, 流动相 B 为甲醇; 阴离子模式下流动相 A 为 5 mmol/L 醋酸铵, pH 值 9.0, 流动相 B 为甲醇; 流动相及梯度洗脱程序见表 1。

质谱条件: 质谱扫描范围 m/z 为 100~1 500, 喷雾电压 3.2 kV, 鞘气流速 35 mL/min, 辅助气流速为

10 mL/min;离子传输管温度 320 °C;极性为阳离子模式、阴离子模式;MS/MS 二级扫描模式为数据依赖型扫描。

表 1 LC-MS/MS 仪器的色谱柱梯度洗脱程序
Tab. 1 Column gradient elution procedure for LC-MS/MS instruments

时间/min	体积分数/%	
	流动相 A	流动相 B
0	98	2
1.5	98	2
12	0	100
14	0	100
14.1	98	2
17	98	2

1.5 数据处理与分析

1.5.1 数据预处理

将原始数据文件导入 Compound Discoverer 3.1 软件(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),进行保留时间、质荷比等参数的筛选,然后对不同样本根据保留时间偏差 0.2 min 和质量偏差 5×10^{-6} 进行峰对齐。根据质量偏差 5×10^{-6} 、信号强度偏差 30%、信噪比 3、最小信号强度 100 000、加和离子等信息进行峰提取,同时对峰面积进行定量,整合目标离子,然后通过分子离子峰和碎片离子进行分子式预测,并与 mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>) 和 mzVault、MassList 本地数据库进行比对,采用空白样本去除背景离子,对定量结果进行归一化,最终得到各种代谢物的定性定量检测结果,以 Excel 格式(.xls)输出并保存。为便于数据分析,将阳离子模式及阴离子模式下所得代谢物定性定量结果合并。

1.5.2 统计分析

将数据预处理所得结果导入 SIMCAP 14.1 软件(瑞典 Umetrics 公司)中进行 PCA 及 PLS 分析,探究不同 PMSI 及不同死因间玻璃体液样本的代谢谱差异。PCA 是一种在没有样本分组信息的情况下对样本进行无监督分析的方法,常用于观察实验样本和 QC 样本的自然聚类趋势^[21],依此确定实验是否稳定。PLS 是基于已知样本的分组信息进行模式识别的有监督多元统计方法,常用于模型建立及寻找组间差异,并采用交叉检验和置换检验来验证模型的可靠性^[22]。PLS 可应用于分类及回归问题,当应用于分类问题时称作 PLS-判别分析(discriminant analysis, DA)。PLS 回归及 PLS-DA 经交叉检验得到验证参数为 R^2X 、 R^2Y 、 Q^2Y 。 R^2X 为模型对自变量 X 数集上的解释能力, R^2Y 为模型对因变量 Y 数集上的解释能力, Q^2Y 表示模

型的预测能力, R^2Y 、 Q^2Y 值越接近 1,说明模型可靠性越强,反之,模型越不可靠。

1.5.3 生物标志物筛选、数学模型建立及验证

本研究借助机器学习中的随机森林(random forest, RF)算法建立水中尸体的 PMSI 推断回归模型及死因判别的分类器模型。如 1.2 节所述,将各时间点样本按照 8:2 的比例随机分为训练集及测试集。将训练集数据导入 R v3.6.1,设训练集样本中各种代谢物的定量结果为自变量(x),分别以各样本的 PMSI 及死因为因变量(y)构建 PMSI 推断回归模型及死因判别的分类器模型。为提高模型的应用性,减少自变量的数目,本研究以全部代谢物构建的回归模型误差为参考,对 RF 模型进行五重十折交叉检验,以 Inc-NodePurity 指标(该值越大,代表变量在该衡量标准下相对更加重要^[23])评估各代谢物在 PMSI 推断回归模型中的重要性,筛选并确定与模型相关性高、贡献度大的生物标志物,并以此建立简化数学模型。

将测试集样本数据导入 R v3.6.1 并代入上述模型中,预测每个样本的 PMSI 及死因,并与实际值比较以验证模型的准确性及可靠性。以平均绝对误差(mean absolute error, MAE)为指标评价回归模型预测 PMSI 与实际值间的误差。以受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线的曲线下面积(area under the curve, AUC)及正确率为指标衡量分类器模型的预测精度。其中 AUC 值越接近于 1 的分类器模型,表明其预测正确率越高。AUC 的判断标准:0.50~0.70 表示模型效果低,0.70~0.85 表示模型效果一般,0.85~0.95 表示效果很好,0.95~1.00 表示效果非常好。

2 结 果

2.1 水中淹没早期大鼠玻璃体液代谢谱 PCA 分析

通过 QC、数据过滤及归一化等数据预处理步骤,最终得到 991 种代谢物,这些代谢物包括氨基酸、糖、有机酸及脂类物质等。通过无监督的 PCA 观察不同 PMSI 及不同死因尸体玻璃体液样本的聚类特征,结果(图 1)显示, QC 样本紧密聚集,表明该实验稳定性好。不同 PMSI 样本在主成分 2 轴上由下至上依次分布,特别是 0 h 组与其他时间组明显分离,说明不同 PMSI 的代谢谱不同,但 12、18、24 h 组间明显重叠。此外,溺死组及死后即刻入水组样本无法通过 PCA 进行有效区分。

2.2 水中淹没早期大鼠玻璃体液代谢物与死因之间的关系

采用 PLS-DA 探索水中尸体 2 种死因间玻璃体液代谢谱的差异。2 种死因间在 PLS-DA 图上有较大范

围重叠,且模型不可靠($Q^2Y=0.585$)(图2A),置换检验结果表明其未过拟合(图2B)。进而借助RF算法建立分类器模型,并在测试集样本中进行验证,AUC为0.63,正确率为50%(图2C~D)。

2.3 水中淹没早期大鼠玻璃体液代谢谱与PMSI之间的关系

PCA分析结果显示,淹没早期的水中大鼠玻璃体液代谢谱具有一定的时间依从性。2种死因间玻璃体液代谢谱差异较小,将不同死因组样本一并分析,应用有监督的PLS回归方法探索水中尸体玻璃体液代谢谱的时间变化规律。在PLS回归得分图(图3A)中,不同PMSI在主成分1轴方向上由左至右依次分布,模型的置换检验结果证明其未过拟合(200次,图3B),表明水中淹没早期大鼠的玻璃体液代谢谱变化具有良好的

时间规律性。

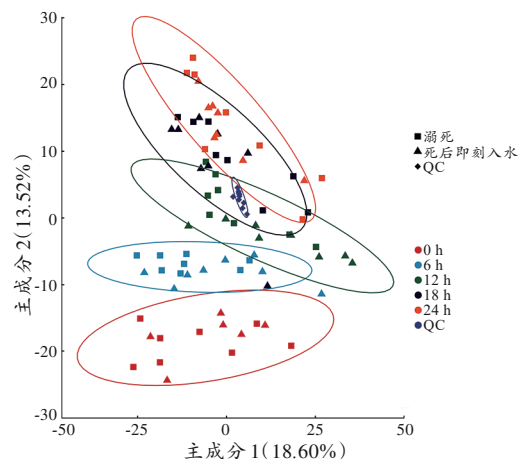
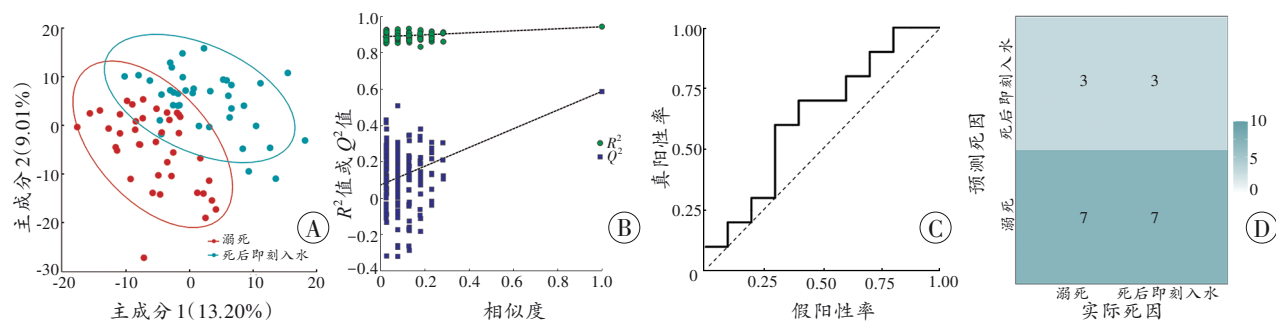


图1 训练集样本PCA得分图

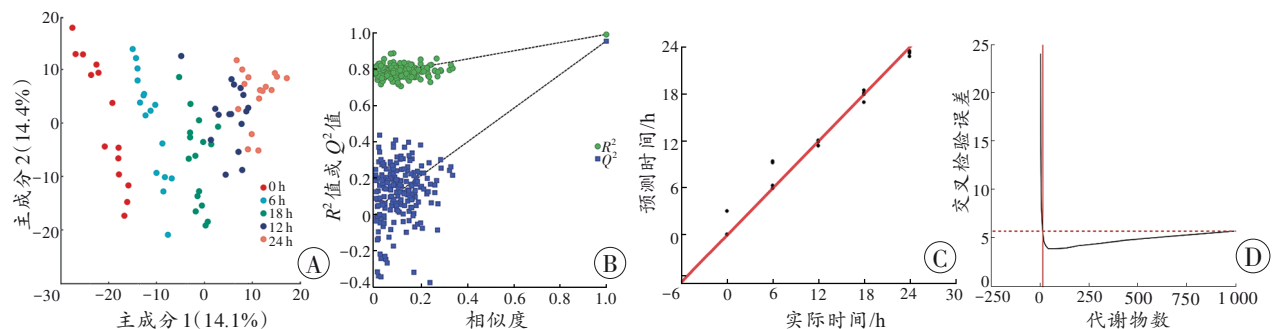
Fig. 1 PCA score plot of samples in the training set



A: 训练集样本PLS-DA模型得分图;B:PLS-DA模型置换检验结果;C:分类器模型ROC曲线(虚线表示随机分类);D:分类器模型对测试集样本预测结果混淆矩阵。

图2 溺死组及死后即刻入水组大鼠尸体玻璃体液代谢谱的差异比较

Fig. 2 Comparison of vitreous humor metabolic profile differences between drowning and postmortem immediately submersion rats cadavers



A: 训练集样本PLS回归模型得分图;B:PLS回归模型置换检验结果;C:测试集样本全代谢物回归模型;D:全代谢物回归模型交叉检验结果。

图3 水中尸体玻璃体液代谢谱变化规律

Fig. 3 Changing pattern of vitreous fluid metabolic profile of cadavers in water

基于代谢谱变化规律,借助RF算法,构建了PMSI推断模型(以下称为“全代谢物回归模型”),并应用测试集样本进行验证。RF回归模型对测试集样本的PMSI预测值与实际值比较,MAE为0.827 h

(图3C、表2)。

2.4 推断水中淹没早期大鼠PMSI生物标志物筛选与模型建立

对全代谢物回归模型进行五重十折交叉检验,结

果表明,模型的预测误差随模型中变量(代谢物)数的增加呈现先下降后逐渐升高的趋势(图3D)。

表2 全代谢物回归模型及简化回归模型对测试集样本的预测结果
Tab. 2 Full regression model and simplified regression model prediction results of metabolites for the samples in the test set

组别	样本号	实际 PMSI	全代谢物回归模型		简化回归模型	
			预测 PMSI	误差	预测 PMSI	误差
溺死	1	0	0.132	0.132	0.060	0.060
	2	0	0.122	0.122	0.028	0.028
	3	6	9.500	3.500	9.780	3.780
	4	6	9.326	3.326	9.276	3.276
	5	12	11.506	-0.494	11.991	-0.009
	6	12	11.978	-0.022	14.436	2.436
	7	18	18.216	0.216	18.663	0.663
	8	18	18.564	0.564	18.590	0.590
	9	24	23.436	-0.564	23.372	-0.628
	10	24	23.328	-0.672	23.267	-0.733
死后即刻入水	11	0	0.170	0.170	0.052	0.052
	12	0	3.138	3.138	1.692	1.692
	13	6	6.036	0.036	5.988	-0.012
	14	6	6.396	0.396	6.549	0.549
	15	12	11.474	-0.526	12.675	0.675
	16	12	12.158	0.158	12.459	0.459
	17	18	17.036	-0.964	17.877	-0.123
	18	18	18.024	0.024	18.089	0.089
	19	24	23.580	-0.420	23.734	-0.266
	20	24	22.896	-1.104	23.189	-0.811

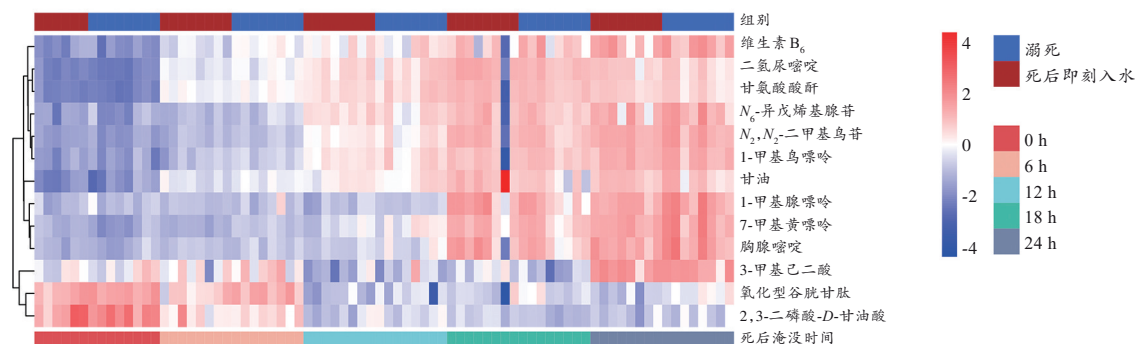
以全代谢物回归模型误差为参考,尽量减少模型中指标的数量,结合模型建立过程中得到的 IncNodePurity 指标评估各代谢物的重要性,最终筛选出 13 种生物标志物(表3),其中 7-甲基黄嘌呤及 N_2, N_2 -二甲基鸟苷重要性明显高于其他生物标志物。

表3 筛选出的 13 种生物标志物信息
Tab. 3 Information of 13 biomarkers selected

序号	生物标志物	分子式	分子量	IncNodePurity 指标
1	7-甲基黄嘌呤	$C_6H_6N_4O_2$	166.048 94	491.568 12
2	N_2, N_2 -二甲基鸟苷	$C_{12}H_{17}N_5O_5$	311.122 23	447.784 05
3	1-甲基腺嘌呤	$C_6H_7N_5$	149.070 00	293.077 24
4	1-甲基鸟嘌呤	$C_6H_7N_5O$	165.064 99	275.406 64
5	胸腺嘧啶	$C_5H_6N_2O_2$	126.043 04	252.437 49
6	N_6 -异戊烯基腺苷	$C_{15}H_{21}N_5O_4$	335.158 77	156.946 87
7	2,3-二磷酸-D-甘油酸	$C_3H_8O_{10}P_2$	265.959 03	125.962 33
8	甘氨酸酸酐	$C_4H_6N_2O_2$	114.043 11	124.229 94
9	甘油	$C_3H_8O_3$	92.047 59	69.222 35
10	维生素 B_6	$C_8H_{11}NO_3$	169.073 65	53.808 27
11	氧化型谷胱甘肽	$C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$	612.151 06	47.229 25
12	3-甲基己二酸	$C_7H_{12}O_4$	160.073 46	43.398 85
13	二氢尿嘧啶	$C_4H_6N_2O_2$	114.043 09	39.347 70

筛选出的生物标志物的热力图(图4)显示,仅死后即刻入水组中 18 h 的个别样本的代谢物含量与组内其他样本有较大差异外,13 种生物标志物含量均呈现较好的 PMSI 依赖性变化趋势。基于 13 种代谢物的含量变化重新建立简化回归模型并应用测试集样本进行验证,简化回归模型 MAE 为 0.847 h(图5、表2),

该简化模型预测结果与全代谢物回归模型的结果之间差异无统计学意义($P>0.05$)。



颜色越红表示样本中该生物标志物含量越高,越蓝表示含量越低。

图4 13种生物标志物含量变化热力图

Fig. 4 Heat map demonstrating dynamic changes in 13 biomarkers

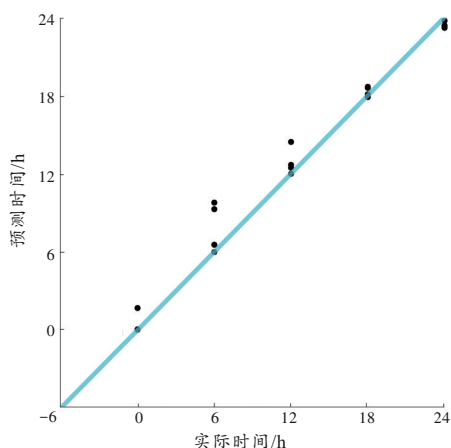


图5 简化回归模型对测试集样本的预测结果与实际结果比较

Fig. 5 Comparision between simplified regression model prediction results for the test set samples and actual results

3 讨论

自然界多种水体环境中均可能发现人类尸体,如江河、海洋及水库等,常为自杀、意外落水、他杀后抛尸入水及自然灾害导致死亡^[3]。水中尸体PMSI推断及死因判别对相关案件的侦破具有重要意义,但现有PMSI推断方法的准确性有待提高。LC-MS/MS技术将色谱高分离性能与质谱高灵敏度、高选择性及高通量的优点相结合,可同时检测死后机体内多种物质或指标的变化及差异^[24],为水中尸体的研究提供了有力工具。本研究基于LC-MS/MS技术检测并分析25℃左右的淡水自然环境中水中早期大鼠玻璃体液中的代谢谱,初步探索了玻璃体液代谢组学在推断水中尸体早期PMSI和死亡原因方面的应用。

本研究在所有样本中共检测到991种代谢物,包

括多类代谢物,构成了早期水中大鼠玻璃体液腐败过程中的代谢谱。HIRAKAWA等^[25]通过研究大鼠的肌肉代谢谱发现不同死因间代谢特征明显不同,并提出代谢组学可用于死因鉴别。但本研究通过PCA、PLS-DA及分类器模型均未观察到溺死组及死后即刻入水组间的差异,说明通过玻璃体液代谢物尚不能有效鉴别水中尸体的死因,这可能与以下原因有关:(1)死亡过程产生的代谢物在不同组织中具有较大的差异;(2)外部或内部刺激引起机体某一组织或器官的代谢变化能够通过血液影响其他组织或器官的代谢谱,玻璃体液受血流的影响较小^[26]。以上分析提示,玻璃体液代谢谱受死因影响小,也为适用于水中不同死因尸体的PMSI推断研究提供了基础。研究^[14,27]表明,玻璃体液中代谢物变化比血液更加缓慢、平稳,且其代谢物浓度与PMI之间的相关性更强。本研究通过PCA及PLS回归分析均可观察到玻璃体液代谢谱在死后24h内连续变化,说明在淡水自然水体环境中玻璃体液代谢谱变化具有较好的时间规律性。死后机体的腐败涉及各种代谢物,其变化和PMI间的相关性非常复杂,无法简化地通过单一指标的线性回归来解释^[28]。相较于传统统计分析方法,RF算法等人工智能机器学习算法可学习变量之间的复杂关系并建立数学模型,从而实现更准确的预测,更适于高维数据的处理与分析^[29]。本研究基于代谢物集群的含量变化应用RF算法建立回归模型用于水中尸体PMSI推断,表明了玻璃体液中的代谢物能够较准确地推断水中尸体早期PMSI。

尽管本研究基于全部的代谢物构建了能够用于推断水中尸体PMSI的模型,但研究^[28]表明,死后多种代谢物的含量变化并非全部都与PMI具有相关性,而且本研究的全代谢物回归模型的交叉检验结果也表

明模型对PMSI预测的准确性随着代谢物种类的增多先升高后下降。此外,为了提高该方法在水中尸体淹没时间推断中的可应用性,有必要对推断PMSI具有重要作用的代谢物进行筛选并构建简化推断模型。因此,以全代谢物回归模型误差为标准,通过RF算法筛选到13种含量变化具有良好时间规律性且对模型贡献度较高的代谢物,并以此建立了准确预测PMSI的简化模型。既往采用玻璃体液中钾离子浓度变化推断PMI所建立的线性回归方程^[30]在24 h内存在较大误差,而本研究得到的PMSI推断模型在24 h内误差低。同时本研究观察到死后即刻入水组中1例经过18 h浸泡后大鼠玻璃体液中目标代谢物含量与该亚组内其他样本具有较大差异,原因可能是实验对象个体间差异较大,但在该样本存在的情况下简化回归模型的预测准确性依旧较高,进一步说明了该模型的可靠性。需要注意的是,本项研究仍处于实验阶段,所得结果尚需在更大数据集及人体标本中通过靶向代谢组学方法检测目标代谢物含量变化,并借助机器学习算法构建数学模型进一步验证。

玻璃体液中代谢物含量的死后变化可能与周围眼组织的死后变化、毗连内眼结构的扩散、细菌的代谢活动甚至蒸发作用等密切相关^[13,26]。近期应用玻璃体液进行代谢组学的研究^[13-14,27,31]发现,次黄嘌呤、牛磺酸、胆碱、肌酸、甘油在内的多种代谢物与陆上不同种属动物的死后经过时间密切相关。本研究中筛选的代谢标志物仅甘油与上述研究中结果研究一致,可能与以下原因有关:(1)死后尸体保存条件不同,陆地上环境和淡水特殊环境的差异;(2)样本种属的差异;(3)土壤与水体中微生物组分和丰度具有较大的差异^[32],不同微生物对同种底物的降解速率及程度差异;(4)水体环境和陆地上尸体的蒸发程度差异。因此,陆地上尸体的相关研究成果并不能直接应用于水中尸体PMSI推断,开展水中尸体的专项研究十分必要。

本研究应用代谢组学技术结合多元统计分析和RF算法对水中尸体玻璃体液代谢谱进行研究,发现代谢物集群随水中尸体的淹没时间延长呈现时序性变化规律,筛选的13种生物标志物建立的简化数学模型,有望用于水中尸体早期PMSI的推断。

参考文献:

- [1] LANG J, ERB R, PECHAL J, et al. Microbial biofilm community variation in flowing habitats: Potential utility as bioindicators of postmortem submersion intervals[J]. *Microorganisms*, 2016, 4(1): 1. doi:10.3390/microorganisms4010001.
- [2] HUMPHREYS M K, PANACEK E, GREEN W, et al. Comparison of protocols for measuring and calculating postmortem submersion intervals for human analogs in fresh water[J]. *J Forensic Sci*, 2013, 58(2): 513-517. doi:10.1111/1556-4029.12033.
- [3] HEATON V, LAGDEN A, MOFFATT C, et al. Predicting the postmortem submersion interval for human remains recovered from U.K. waterways[J]. *J Forensic Sci*, 2010, 55(2): 302-307. doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01291.x.
- [4] PALAZZO C, PELLETTI G, FAIS P, et al. Post-mortem submersion interval in human bodies recovered from fresh water in an area of Mediterranean climate. Application and comparison of preexisting models[J]. *Forensic Sci Int*, 2020, 306: 110051. doi: 10.1016/j.forsciint.2019.110051.
- [5] 袁慧雅,赵锐,高利娜,等. 水中尸体死后淹没时间推断研究进展[J]. *法医学杂志*, 2020, 36(6): 801-806. doi:10.12116/j.issn.1004-5619.2020.06.010.
- [6] YUAN H Y, ZHAO R, GAO L N, et al. Research progress on estimation of postmortem submersion interval[J]. *Fayixue Zazhi*, 2020, 36(6): 801-806.
- [7] PIETTE M H A, DE LETTER E A. Drowning: Still a difficult autopsy diagnosis[J]. *Forensic Sci Int*, 2006, 163(1/2): 1-9. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.10.027.
- [8] GIANCAMILLO A D, GIUDICI E, ANDREOLA S, et al. Immersion of piglet carcasses in water - The applicability of microscopic analysis and limits of diatom testing on an animal model[J]. *Leg Med*, 2010, 12(1): 13-18. doi:10.1016/j.legalmed.2009.09.007.
- [9] NICHOLSON J K, LINDON J C. Metabonomics[J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1054-1056. doi: 10.1038/4551054a.
- [10] BROOKS J W. Postmortem changes in animal carcasses and estimation of the postmortem interval[J]. *Vet Pathol*, 2016, 53(5): 929-940. doi: 10.1177/0300985816629720.
- [11] WU Z G, LU X, CHEN F, et al. Estimation of early postmortem interval in rats by GC-MS-based metabolomics[J]. *Leg Med*, 2018, 31: 42-48. doi: 10.1016/j.legalmed.2017.12.014.
- [12] ZHANG J, LI B, WANG Q, et al. Application of Fourier transform infrared spectroscopy with chemometrics on postmortem interval estimation based on pericardial fluids[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 18013. doi:10.1038/s41598-017-18228-7.
- [13] BIERENS J J, LUNETTA P, TIPTON M, et al. Physiology of drowning: A review[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2016, 31(2): 147-166. doi: 10.1152/physiol.00002.2015.

- [13] LOCCI E, STOCCHERO M, NOTO A, et al. A ^1H NMR metabolomic approach for the estimation of the time since death using aqueous humour: An animal model[J]. *Metabolomics*, 2019, 15 (5) : 76. doi:10.1007/s11306-019-1533-2.
- [14] ZELENTOVA E A, YANSHOLE L V, SNYTIKOVA O A, et al. Post-mortem changes in the metabolomic compositions of rabbit blood, aqueous and vitreous humors[J]. *Metabolomics*, 2016, 12 (11) : 1-11. doi: 10.1007/s11306-016-1118-2.
- [15] DONALDSON A E, LAMONT I L. Metabolomics of post-mortem blood: Identifying potential markers of post-mortem interval[J]. *Metabolomics*, 2015, 11(1): 237-245. doi:10.1007/s11306-014-0691-5.
- [16] PALMIERE C, MANGIN P. Urea nitrogen, creatinine, and uric acid levels in postmortem serum, vitreous humor, and pericardial fluid[J]. *Int J Legal Med*, 2015, 129(2):301-305. doi:10.1007/s00414-014-1076-z.
- [17] SWAIN R, KUMAR A, SAHOO J, et al. Estimation of post-mortem interval: A comparison between cerebrospinal fluid and vitreous humour chemistry[J]. *J Forensic Leg Med*, 2015, 36: 144-148. doi:10.1016/j.jflm.2015.09.017.
- [18] TUMRAM N K, BARDALE R V, DONGRE A P. Postmortem analysis of synovial fluid and vitreous humour for determination of death interval: A comparative study[J]. *Forensic Sci Int*, 2011, 204(1/2/3) : 186-190. doi:10.1016/j.forsciint.2010.06.007.
- [19] 杨明真, 张天叶, 李辉军, 等. 玻璃体液推断死亡时间的研究进展[J]. *法医学杂志*, 2018, 34(2) : 165-170. doi: 10.3969/j.issn.1004-5619.2018.02.013
- YANG M Z, ZHANG T Y, LI H J, et al. Research progress on postmortem interval estimation by vitreous humor[J]. *Fayixue Zazhi*, 2018, 34(2) : 165-170.
- [20] WANG L L, ZHANG F Y, DONG W W, et al. A novel approach for the forensic diagnosis of drowning by microbiological analysis with next-generation sequencing and unweighted UniFrac-based PCoA[J]. *Int J Legal Med*, 2020, 134 (6) : 2149-2159. doi:10.1007/s00414-020-02358-1.
- [21] TEBANI A, MAUHIN W, ABILY-DONVAL L, et al. A proteomics-based analysis reveals predictive biological patterns in fabry disease[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(5):1325. doi:10.3390/jcm9051325.
- [22] 阿基业, 何骏, 孙润彬. 代谢组学数据处理——主成分分析十个要点问题[J]. *药学报*, 2018, 53(6) : 929-937. doi:10.16438/j.0513-4870.2017-1288.
- A J Y, HE J, SUN R B. Multivariate statistical analysis for metabolomic data: The key points in principal component analysis[J]. *Yaixue Xuebao*, 2018, 53(6) : 929-937.
- [23] CARVAJAL T M, VIACRUSIS K M, HERNANDEZ L F T, et al. Machine learning methods reveal the temporal pattern of dengue incidence using meteorological factors in metropolitan Manila, Philippines[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18 (1) : 183. doi: 10.1186/s12879-018-3066-0.
- [24] 李嘉敏, 苏锐冰, 王典, 等. 家猪死后脑组织 GC-MS 检测和死亡时间推断的研究[J]. *中国法医学杂志*, 2019, 34(2) : 131-135. doi:10.13618/j.issn.1001-5728.2019.02.0005.
- LI J M, SU R B, WANG D, et al. GC-MS detection in the corpse brain tissue of swine for post-mortem interval estimation[J]. *Zhongguo Fayixue Zazhi*, 2019, 34(2) : 131-135.
- [25] HIRAKAWA K, KOIKE K, UEKUSA K, et al. Experimental estimation of postmortem interval using multivariate analysis of proton NMR metabolomic data[J]. *Leg Med*, 2009, 11: S282-S285. doi: 10.1016/j.legalmed.2009.02.007.
- [26] 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. doi:10.1111/j.1556-4029.2010.01501.x.
- [27] ZELENTOVA E A, YANSHOLE L V, MELNIKOV A D, et al. Post-mortem changes in metabolomic profiles of human serum, aqueous humor and vitreous humor[J]. *Metabolomics*, 2020, 16 (7) : 80. doi: 10.1007/s11306-020-01700-3.
- [28] DAI X H, FAN F, YE Y, et al. An experimental study on investigating the postmortem interval in dichlorvos poisoned rats by GC/MS-based metabolomics[J]. *Leg Med*, 2019, 36: 28-36. doi:10.1016/j.legalmed.2018.10.002.
- [29] CHEN L, GONG T, KOSINSKI M, et al. Building a profile of subjective well-being for social media users[J]. *PLoS One*, 2017, 12 (11) : e0187278. doi:10.1371/journal.pone.0187278.
- [30] BORTOLOTTI F, PASCALI J P, DAVIS G G, et al. Study of vitreous potassium correlation with time since death in the postmortem range from 2 to 110 hours using capillary ion analysis[J]. *Med Sci Law*, 2011, 51 (S1) : S20-S23. doi: 10.1258/msl.2010.010063.
- [31] ROSA M F, SCANO P, NOTO A, et al. Monitoring the modifications of the vitreous humor metabolite profile after death: An animal model[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 627201-627207. doi: 10.1155/2015/627201.
- [32] HAKANEN E, LEHTIMAKI J, SALMELA E, et al. Urban environment predisposes dogs and their owners to allergic symptoms[J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1) : 1585. doi:10.1038/s41598-018-19953-3.

(收稿日期:2021-06-21)

(本文编辑:张建华)