

大鼠死后脑组织 FTIR 光谱变化与死亡时间的关系

柯咏¹, 王世伟², 鲁庆阳¹, 黄平¹, 邢博¹, 王振原^{1*}

1 西安交通大学医学院法医学系, 陕西 西安 710061

2 西安市公安局新城分局, 陕西 西安 710043

摘要 应用傅里叶变换红外(FTIR)光谱技术分析大鼠死后脑组织随死亡时间推移的化学变化过程, 为死亡时间推断的研究提供新的途径与数据。大鼠断颈处死后置于室温(20 ± 2) °C 环境下, 在不同时间点提取大鼠脑皮质, 运用 FTIR 光谱仪检测不同化学基团的变化。随着死亡时间的推移, 大鼠脑组织 FTIR 光谱的主要吸收峰峰位没有明显变化, 而其峰高有明显差异: (1) 与核酸有关的谱带的相对峰强呈明显下降趋势; (2) 酰胺 II 和 I 的峰强比呈上升趋势; $1\ 338$, $1\ 313\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 398\ \text{cm}^{-1}$ 的峰强比呈下降趋势。(3) $1\ 456$ 和 $1\ 398\ \text{cm}^{-1}$ 谱带的峰强各自呈下降和上升趋势。(4) $2\ 852$, $2\ 871$, $2\ 923$, $2\ 958\ \text{cm}^{-1}$ 的峰强相对于 $1\ 647\ \text{cm}^{-1}$ 而言, 呈上升趋势。

关键词 FTIR; 死亡时间; 脑组织; 化学基团

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)11-2545-05

引言

死亡时间的推断一直是法医学研究的重点和难点之一。死亡时间的确定有利于死亡方式和死亡性质的判断, 可为破案提供线索, 缩小侦查范围。目前国内外法医学者运用多种技术手段推断死亡时间, 但无论哪一种方法都有其不完善的地方和难以解决的问题存在^[1-3]。

傅里叶变换红外光谱(FTIR)能准确灵敏地对细胞内物质相应基团的分子振动变化进行检测, 且特异性高、操作简便^[4-9]。构成组织和细胞的基本物质是蛋白质、糖、脂肪、核酸等, 因此细胞和组织红外光谱是这几类生物分子相互叠加的结果, 红外光谱可精确反映出其含量和构型的变化。

生物体死亡后由于细胞内各类水解酶及腐败菌的化学作用, 生物分子含量、结构及其化学基团均会发生变化。本研究以死后大鼠脑组织为样本, 运用 FTIR 光谱技术进行动态监测, 分析其随死亡时间的推移所呈现出的变化规律, 从而为推断死亡时间提供一种实用的研究方法和有效数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及取材

成年健康 Sprague Dawley 大鼠 8 只(雄性, 体重(240 ± 10) g, 由西安交通大学动物实验中心提供)以脱颈椎法快速处死后置于室温(20 ± 2) °C 环境下。动物实验遵守《国际实验动物保护原则》(U. S. 1985)。分别于大鼠死后 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h 取其脑组织皮质部分约 10 mg, 组织取出后立即置于液氮中保存(相同大鼠重复取材、测量)。

1.2 检材处理与测量方法

取出液氮保存的脑组织, -50 °C 真空冻干 24 h, 取约 2 mg 冻干脑组织研磨后添加 200 mg KBr 粉末研匀压片。使用日本 Shimadzu 公司的 FTIR-8400S 型傅里叶红外光谱仪在 $4\ 000 \sim 400\ \text{cm}^{-1}$ 范围内进行红外光谱扫描, 分辨率为 $4\ \text{cm}^{-1}$, 扫描次数累计 20 次。为消除因所取组织的重量大小不同而导致的各类化学基团含量差异所带来的影响, 本实验采用不同吸收峰的相对强度作为分析数据。

1.3 FTIR 图谱的意义

FTIR 图谱由吸收峰的峰位和峰强来确定, 不同生物分子的不同化学基团都有一个特定的吸收峰, 故不同峰位代表不同化学基团, 特定分子所含化学基团的振动就会产生特异的峰位。每个峰位的峰强代表相对应的化学基团在组织中的含量, 运用峰位和峰强可确定不同化学基团在组织中的含量。本研究根据吸收峰前后出现顺序选取 3 个研究范围

收稿日期: 2007-07-16, 修订日期: 2007-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471935)资助

作者简介: 柯咏, 1982 年生, 西安交通大学医学院法医学系硕士研究生 e-mail: keyong_best@stu.xjtu.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: wzy218@mail.xjtu.edu.cn

($2\,958\sim 2\,852$, $1\,647\sim 1\,398$, $1\,338\sim 1\,080\text{ cm}^{-1}$) 的 12 个不同吸收峰($2\,958$, $2\,923$, $2\,871$, $2\,852$, $1\,647$, $1\,541$, $1\,456$, $1\,398$, $1\,338$, $1\,313$, $1\,238$, $1\,080\text{ cm}^{-1}$) 进行研究, 观察其峰位、峰强随死亡时间的变化, 用相对峰强比值定量分析死后脑组织的化学基团变化。12 个吸收峰的化学指认见表 1^[7-14]。

Table 1 FTIR spectra peaks and assignments

波数/ cm^{-1}	意义指认
2 958	CH_3 反对称伸缩振动, 代表脂质
2 923	CH_2 反对称伸缩振动, 代表脂质
2 871	CH_3 对称伸缩振动, 代表脂质
2 852	CH_2 对称伸缩振动, 代表脂质
1 647	酰胺 I 带 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动
1 541	酰胺 II 带 CNH 弯曲振动, $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动
1 456	CH_2 变角振动, 代表脂类
1 398	可能为 CH_3 对称和反对称伸缩振动, 代表蛋白质或者可能为 CH_3 伞形或变角振动, $\text{C}-\text{H}$ 变角振动, $\text{C}-\text{OH}$ 的振动
1 338	CH_2 剪切振动, 代表胶原蛋白等结缔组织
1 313	可能为酰胺 III 带
1 238	PO_2^- 反对称伸缩振动, 代表核酸
1 080	PO_2^- 对称伸缩振动, 代表核酸

1.4 数据处理与分析

红外光谱图分析运用 Shimadzu 的 IR Solution Version 1.10 软件, 测量红外光谱中各个谱带峰位、峰强度, 并计算不同吸收峰的强度比。采用 SPSS 13.0 统计软件对所得数据进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 不同死亡时间组 FTIR 光谱峰位变化

在 $4\,000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 频率范围内测定不同死亡时间的 FTIR 图谱, 研究显示吸收谱带没有明显的峰位改变(图 1)。这说明大鼠死亡后, 脑组织所含化学基团构型在一定时间内并不因生物体死亡后细胞中水解酶和腐败菌的化学作用而发生明显的改变。

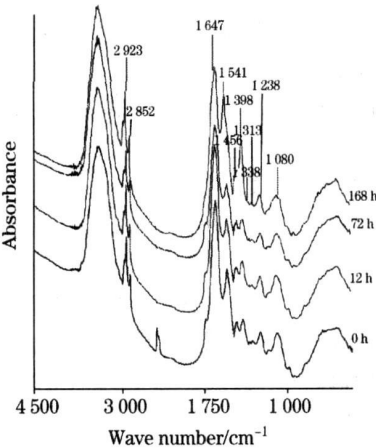


Fig 1 FTIR spectra of rat's brain in 0, 12, 72, and 168 h since death

2.2 不同死亡时间组 FTIR 图谱吸收峰强比变化

(1) $1\,080$ 和 $1\,238\text{ cm}^{-1}$ 分别是构成多聚核苷酸链的磷酸

二酯键(PO_2^-)的对称和非对称伸缩振动峰^[15], 可以反映组织中的核酸含量。本研究分析了死后不同时间点 $1\,080$, $1\,238$ 和 $1\,398\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰的强度比值($I_{1\,080}/I_{1\,398}$, $I_{1\,238}/I_{1\,398}$), 图 2 反映了脑组织中核酸的变化趋势。可以看出, 随着死亡时间的延长, 大鼠脑组织磷酸二酯键含量逐渐下降。这说明了磷酸二酯键在生物体死后发生裂解, 转变为其他化学基团, 即组织中的 DNA 和 RNA 含量随死亡时间的推移而降解。国内外法医学者通过大量的研究表明, 核酸降解与

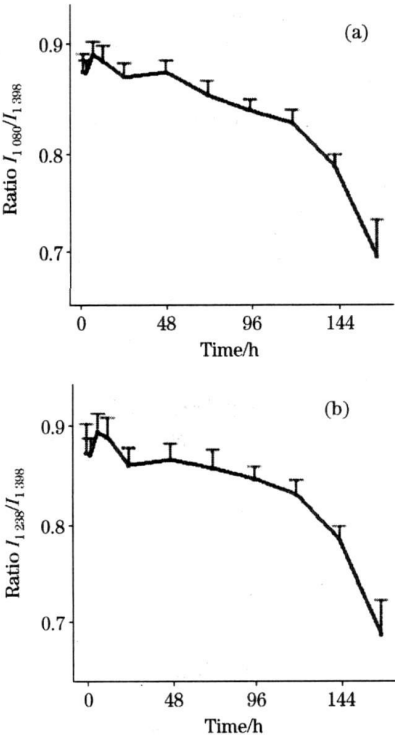


Fig 2 Changes in the FTIR absorbance bands ratios with different PMI

(a) $I_{1\,080}/I_{1\,398}$; (b): $I_{1\,238}/I_{1\,398}$

死亡时间变化存在必然联系^[16], 本实验的结果也从 FTIR 光谱学角度支持这一观点。

(2) $1\ 647$ 和 $1\ 541\ \text{cm}^{-1}$ 分别代表蛋白质的酰胺 I 带 ($\text{C}=\text{O}$) 和蛋白质酰胺 II 带 (CNH), 酰胺 I 带可以用来测定蛋白二级结构的变化, 酰胺 II 带可作为半定量分析的标准谱带^[17], 而 $1\ 541$ 和 $1\ 647\ \text{cm}^{-1}$ 谱带强度之间的比值 ($I_{1\ 541}/I_{1\ 647}$) 在一定程度上可以反应酰胺 I 和 II 含量的变化。由图 3

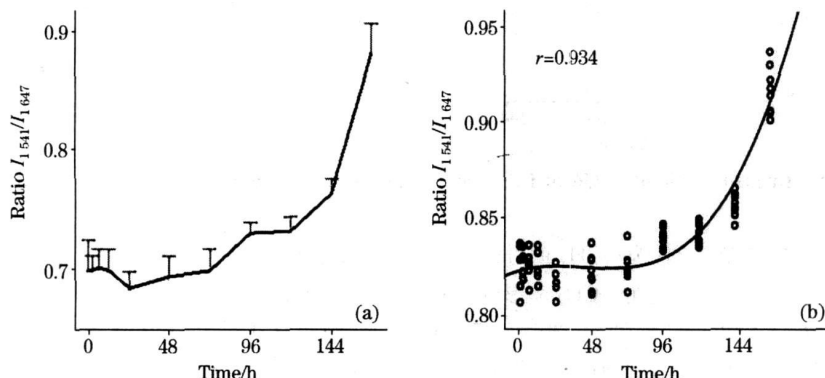


Fig 3 Intensity ratio of $1\ 541$ to $1\ 647\ \text{cm}^{-1}$ and the regression curve of the ratio and the PMI

(3) $1\ 338$ 和 $1\ 313\ \text{cm}^{-1}$ 可能为 CH 面内变角振动、环状 CH 振动或 CH_2 变角振动和蛋白酰胺 II 带的吸收峰^[9], 主要反映的是组织内胶原蛋白^[8]。由图 1 可以看出, 随着死亡时间的推移, 它们的含量变化不明显, 而 $I_{1\ 313}/I_{1\ 398}$ 以及 $I_{1\ 338}/I_{1\ 398}$ 则呈下降趋势, FTIR 图谱显示这是因为 $1\ 398\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰强增加的缘故。

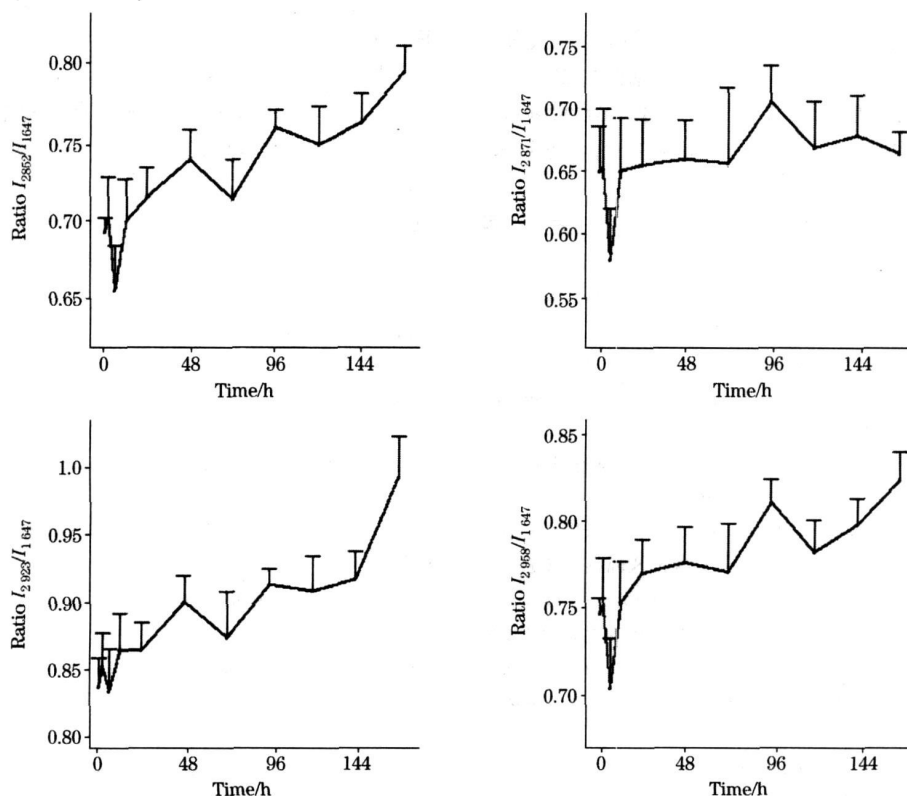


Fig 4 Changes of $2\ 852$, $2\ 871$, $2\ 923$ and $2\ 958$ to $1\ 647\ \text{cm}^{-1}$ absorbance bands ratios at different PMI

(a) 可以看出, 二者比值呈上升趋势。说明了大鼠死后酰胺 I 带的含量减少, 而酰胺 II 带含量相对有所增加。对大鼠死后 168 h 内酰胺 I 和 II 的比值变化进行统计分析后, 得到其与死亡时间的相关系数 (r) 为 0.934, 回归曲线如图 3(b) 所示, 回归方程为

$$y = (1.19E-007)x^3 + (-1.9E-005)x^2 + 0.001x + 0.697$$

(4) $2\ 852$, $2\ 871$, $2\ 923$ 和 $2\ 958\ \text{cm}^{-1}$ 主要反映细胞膜脂质亚甲基、甲基的对称、反对称伸缩振动^[10]。由于脂类物质多含有较长的烃链, 所以 CH_2 和 CH_3 的振动方式主要反映脂类的变化^[18]。采用 $2\ 852$, $2\ 871$, $2\ 923$, $2\ 958$ 和 $1\ 647\ \text{cm}^{-1}$ 谱带强度之间的比值来分析脂类的变化情况, 其含量的变化趋势如图 4 所示。 $1\ 456\ \text{cm}^{-1}$ 谱带为 $(-\text{CH}_2)_n$ 变角振

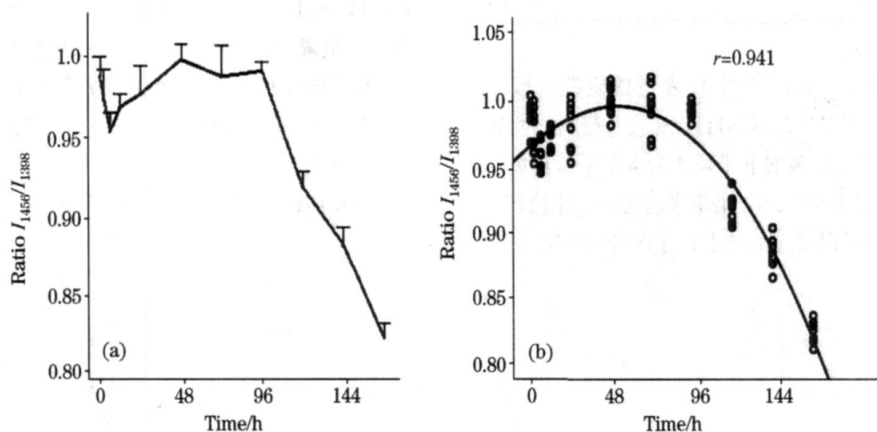


Fig 5 Intensity ratio of 1456 to 1398 cm^{-1} and the regression curve of the ratio and the PMI

动, 代表脂类。1398 cm^{-1} 谱带, 可能为 $-\text{CH}_3$ 的对称和反对称伸缩振动, 代表蛋白质^[12], 也可能为 $-\text{CH}_3$ 伞形或变角振动, C—H 变角振动, C—OH 的振动^[5]。采用 1456 和 1398 cm^{-1} 的强度比值来分析其各自变化情况, 如图 5(a) 所示。说明随着时间的推移, 其峰强分别表现为降低和升高的变化趋势, 其机制尚无法解释。对大鼠死后 168 h 内 1456 和 1398 cm^{-1} 强度比的变化进行统计分析后, 得到其与死亡时间的相关系数(r) 为 0.941, 回归曲线如图 5(b) 所示, 回归方程为

$$y = - (1.4 \times 10^{-8})x^3 + (-9.5 \times 10^{-6})x^2 + 0.001x + 0.966$$

3 结 论

生物组织是由蛋白质、核酸、碳水化合物等生物大分子所构成, 而生物大分子又是由基本的化学基团构成。FTIR 光谱能够根据不同有机分子化学基团的振动准确地检测出组织中所含的化学基团以及各类化学基团的含量。近年来,

FTIR 光谱技术被大量地应用于多个研究领域, 如癌症诊断、细胞分型、药物筛选、食品的新鲜度测量等。国内外法科学工作者也有将 FTIR 光谱技术运用于痕迹检验、毒品分析、皮肤损伤活性研究等^[19-21]。FTIR 光谱可以在同一光谱图中反映出多种化学物质随死亡时间推移所发生的变化, 具有很高的灵敏性, 且不用对组织进行复杂处理和破坏。

通过对大鼠死后不同死亡时间点脑组织 FTIR 光谱的比较发现, 随着死亡时间的推移, (1) 核酸含量下降明显; (2) 酰胺 I 带含量在死后逐渐减少, 而酰胺 II 带含量相对有所增加; (3) 1398 cm^{-1} 处峰强上升趋势明显; (4) 脂类的含量变化同样存在上升趋势。这和我们课题组所作的大鼠死后其他脏器的变化趋势基本一致^[22]。

由于死后较多因素影响组织的化学反应, 如温度、湿度、死亡原因等, 故 FTIR 光谱技术在不同影响因素、不同组织器官的研究将进一步深入, 本实验是系列研究的一部分。由于大鼠脑组织和人脑有较好的生物相似性, 有望成为 FTIR 光谱对人尸体研究时的良好检材。

参 考 文 献

- [1] Knight B. Simpson's Forensic Medicine. London: Oxford University Press, 1996.
- [2] ZHAO Zr qin(赵子琴). Forensic Pathology, the Third Version(法医病理学, 第3版). Beijing: People's Medical Publishing House(北京: 人民卫生出版社), 2004.
- [3] Bocaz Beneventi G, Tagliaro F, Bortolotti F, et al. Legal Med., 2002, 16: 5.
- [4] YANG Jiao-lan, LUO Tian(杨娇兰, 罗 添). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(4): 610.
- [5] LING Xiao-feng, XU Zhi, XU Yi-zhuang, et al(凌晓峰, 徐 智, 徐怡庄, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(2): 198.
- [6] WU Jir-guang(吴瑾光). The Techniques and Application of Modern Fourier Transform Infrared Spectroscopy(近代傅里叶变换红外光谱技术及应用). Beijing: Literature Press of Science and Technology(北京: 科学技术文献出版社), 1994.
- [7] Mantsch H H, Chapman D. Infrared Spectroscopy of Biomolecules. New York: John Wiley, 1996.
- [8] FAN Xiao-yan(范晓燕). Life Science Research(生命科学研究), 2003, 7(2): 84.
- [9] Stuart B. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. New York: John Wiley & Sons, 2004.
- [10] SHEN Shi-jie, LIU Bing-yu, LI Qing, et al(沈世杰, 刘炳玉, 李 清, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(1): 28.
- [11] GU Zhi-yuan(谷志远). The Modern Medical Molecular Biology(现代医学分子生物学). Beijing: People's Military Medical Press(北京: 人民军医出版社), 1998.
- [12] ZHOU Su, XU Zhi, LING Xiao-feng, et al(周 苏, 徐 智, 凌晓峰, 等). Chinese Journal of Oncology(中华肿瘤杂志), 2006, 28(7):

512

- [13] TANG Wei yue, LIU Ren ming, LI Yun tao, et al(唐伟跃, 刘仁明, 李云涛, 等). Laser & Infrared(激光与红外), 2006, 36(7): 577.
- [14] YAN Xin hui, TANG Wei yue, HOU Xiao qiang, et al(闫新惠, 唐伟跃, 侯晓强, 等). Laser & Infrared(激光与红外), 2007, 37(3): 240.
- [15] Taillandier E, Liquier F. Methods Enzymol., 1992, 211: 307.
- [16] Laura A Johnson, James A J Ferris. Forensic Science International, 2002, 126(1): 43.
- [17] Surewicz W K, Mantsch H H. Biochim. Biophys. Acta, 1988, 952(2): 115.
- [18] Enzo Benedetti, Federico Papineschi, Piergiorgio Vergamini, et al. Leukemia Research, 1984, 8(3): 483.
- [19] Mantsch H H, Cho Smith L, Shaw R A. Vibrational Spectroscopy, 2002, 30: 31.
- [20] Zieba Palus J, Kunicki M. Forensic Sci. Int., 2006, 158: 164.
- [21] HUANG Ping, YANG Guang de, TU O Ya, et al(黄 平, 杨广德, 托 娅, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(6): 1074.
- [22] HUANG Ping, TIAN Wei ping, YANG Guang de, et al(黄 平, 田卫平, 杨广德, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(10): 1962.

The Correlation between Postmortem Interval and Fourier Transform Infrared Spectra in Rat's Brain

KE Yong¹, WANG Shi wei², LU Qing yang¹, HUANG Ping¹, XING Bo¹, WANG Zhen yuan^{1*}

1. Department of Forensic Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

2. Institute of Criminal Science of Xincheng, Xi'an Public Security Bureau, Xi'an 710043, China

Abstract In the present study, FTIR spectroscopy was applied to observe the process of postmortem degradation in rat's brain and a lot of useful data for the estimation of postmortem interval (PMI) were provided. Sprague Dawley male rats (weight 240 ± 10 g) were chosen and sacrificed by cervical dislocation. The bodies were kept in a controlled environmental chamber set at $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, and their brain cortex as the measuring sample which was extracted at 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h from the 8 rats. The tissues were freeze dried in a vacuum at -50°C overnight in order to dehydrate them. About 2 mg freeze dried tissues were mixed with 200 mg KBr and then ground in an agate mortar for 5 min. The mixture then was pressed into a pellet with a thickness of 0.4 mm and a diameter of 12 mm. The FTIR spectra were quantitatively recorded at room temperature in the range $4000-400\text{ cm}^{-1}$ on a Shimadzu 8400S spectrometer (Shimadzu, Japan). IR solution 1.10 software (Shimadzu, Japan) was used for the analysis of the FTIR spectra and for recording the data from the spectra. With the PMI increasing, the peak position of main absorbance bands in the FTIR spectra showed no significant difference, but there was a dramatic variance in the intensity: (1) The relative intensity at 1080 and 1238 cm^{-1} (I_{1080}/I_{1398} and I_{1238}/I_{1398}) related with nucleic acid tended to decrease obviously. (2) The intensity ratio at amide II and I (I_{1541}/I_{1647}) increased with the PMI increasing. The intensity at 1338 and 1313 cm^{-1} varied slightly, but their intensity ratio to 1398 cm^{-1} decreased. (3) The intensity at 1456 and 1398 cm^{-1} showed a trend of decreasing and increasing respectively. (4) Compared with the intensity at 2871 cm^{-1} , the intensity at 2852 , 2871 , 2923 and 2958 cm^{-1} tended to increase, but the increasing tendency at 2871 cm^{-1} was slight. It is concluded that FTIR spectroscopy is going to be an effective method for estimating the PMI in medicolegal practice and the brain tissue may be a suitable marker as a potential sample.

Keywords FTIR; PMI; Brain tissue; Chemical group

(Received Jul. 16, 2007; accepted Oct. 18, 2007)

* Corresponding author