

常温下溶血程度估算死亡时间的初步探究

赵晓云^a,李捷^b,史俊展^a,马晶晶^a,周路敏^a,姚泽伟^a,韦铭菲^a,李凡^a

(河南科技大学 a.法医系;b.第二附属医院中心实验室,河南 洛阳 471000)

摘要:为探究人体血液溶血程度随时间变化的规律,用以估算死亡时间,本研究用抗凝管抽取23名年龄段20~30岁健康志愿者的肘静脉血,于室温25℃下每间隔6h利用酶标仪检测其吸光度(OD值),记录达到不同溶血程度所对应的时间。结果显示:常温下血样溶血程度随溶血时间延长逐渐加重,溶血程度与溶血时间在7天内存在线性相关($r=0.866$),且经SPSS分析发现,不同性别溶血速度无差异。结论是,在法医工作中,死亡时间在7天内的尸体,可通过建立溶血程度与溶血时间的回归方程初步估算死亡时间。

关键词:法医病理学;推断死亡时间;溶血

中图分类号:DF795.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-8020(2023)02-0179-04

死亡时间(Postmortem Interval, PMI)被定义为从死亡到尸体被发现时的时间,也可以称为死后间隔时间或死后经历时间,是案件侦破工作的原点。PMI的推断一直以来都是法医学领域的研究热点问题,对侦查方向的确定、犯罪嫌疑人的排除及认定、推断作案时间等犯罪现场重建有着尤为重要的意义^[1]。传统推断PMI的方法目前有一定限制,多年来国内外学者尝试了各种技术方法,对机体死后不同观测指标时序性变化进行研究,并取得了较大的研究进展^[1]。越来越多的技术方法可应用于法医学PMI推断,如尸体现象中尸斑的颜色变化趋势^[2],昆虫的发育或演替规律^[3-4],CT等物理化学指标^[5-6],基因组学研究^[7],代谢组学、脂质组学及蛋白组学研究^[5,8-9]等。

溶血是指各种因素造成的血细胞破裂,细胞内容物逸出的现象^[10],在法医工作中极为常见。在临床工作中,血样的采集、保存条件都可能会引起血液溶血,进而对临床检验结果造成影响^[11]。在法医学工作中,血液作为检测尸体生化指标的常用检材,检材受死后,由于尸体保存环境等的影响,会产生不同程度的溶血,随着死亡时间延长,溶血程度加重。已有研究^[12]表明,不同死亡原因的大鼠在死后不同时间的红细胞溶血速度不同。基于此,本文根据溶血程度随时间的延长而加重这一现象

来设计实验,进而探究常温下人体血液溶血程度随时间变化的规律,为法医学PMI的推断提供新的研究思路。

1 材料和方法

1.1 主要仪器

本研究所用仪器主要包括:DG3022酶标仪(购于Thermo Fisher Scientific),HH·S21-4S恒温水浴锅(购于上海跃进医疗器械有限公司),TDL-80-2B离心机(购于上海安亭科学仪器厂)。

1.2 实验步骤及方法

1.2.1 样本来源

随机抽取23例年龄在20~30岁、体型中等、身体健康的志愿者,其中男性11例,女性12例,由河南科技大学校医院协助,用肝素抗凝管抽取肘窝部静脉血3mL,本实验已取得上述人员的知情同意。

1.2.2 溶血程度分级标准建立

血样离心后分离血浆和血细胞层,将细胞层反复冻融3次,使细胞层内细胞完全破裂,与血浆

收稿日期:2022-03-16;修回日期:2022-05-19

基金项目:河南科技大学SRTP项目(2020315)

通信作者简介:李凡(1964—),男,教授,硕士研究生导师,博士,研究方向为法医病理学及法医临床学研究。E-mail:fanly@haust.edu.cn

不同比例混合 ($V_{\text{冻融红细胞}}/V_{\text{血清}}$ 分别为 0、1/128、1/32、1/16、1/8)^[13], 制成标准溶血样本, 分别对溶血程度 0 级、1 级、2 级、3 级、4 级, 利用酶标仪测量不同溶血程度所对应的吸光度值, 统计分析其 95% 的置信区间。

1.3 待测样本实验

根据溶血程度 0~4 级分为 5 个小组, 所有样品均放于 25 °C 水浴锅中, 每隔 6 h 取出, 混匀离心后用酶标仪测其上清吸光度值, 若在人工溶血程度分级范围内, 则记录 OD 值及对应时间。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 26.0 统计软件处理数据。各组别

组内比较均采用单因素方差分析及多个均数之间两两比较的 LSD 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 溶血程度分级与其对应的 OD 值

人工溶血程度分级与其对应的 OD 值见表 1。可见 OD 值随溶血程度等级升高而升高。

2.2 溶血程度随溶血时间变化规律简单线图

溶血程度随溶血时间的变化规律见图 1。由图 1 可知, 随着溶血时间的延长, 溶血程度与溶血时间呈现线性正相关的趋势。

表 1 溶血程度分级与其对应的 OD 值

Tab.1 The grade of hemolysis and its corresponding OD value

溶血程度分级	0 级	1 级 (1/128)	2 级 (1/32)	3 级 (1/16)	4 级 (1/8)
95% 可信区间 (OD 值)	0.3~0.36	0.64~0.74	1.64~1.86	3.46~3.58	7.29~7.76

注: 组间比较结果 $F=2\ 500.117, P<0.001$, 差异具有统计学意义。

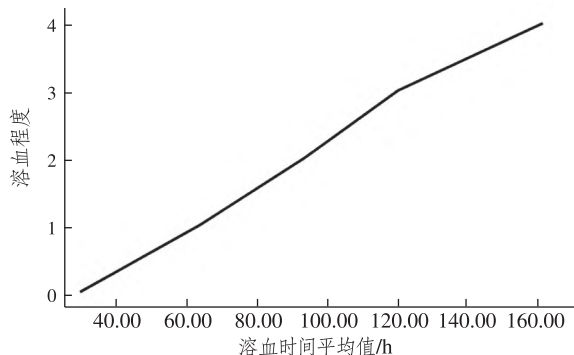


图 1 溶血程度随溶血时间的变化规律

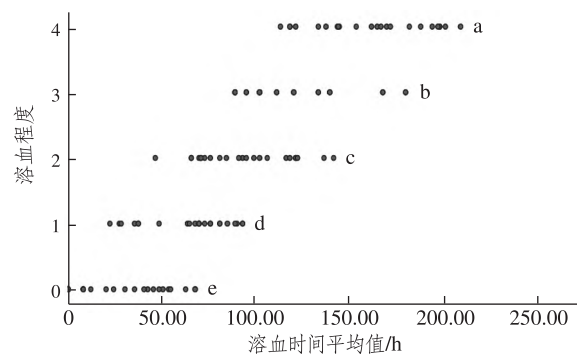
Fig.1 The variation of hemolysis degree with hemolysis time

根据相关与回归分析得出方程: $y=0.024x+0.205$ (y : 溶血程度分级, x : 溶血时间平均值, $r=0.866, P<0.05$, 图 1)。

2.3 溶血程度随溶血时间变化规律简单散点图

溶血程度随溶血时间的变化规律见图 2。由图 2 可知, 达到不同溶血程度时所对应的溶血时

间存在显著差异, 但时间上存在一定程度的重叠。



注: 图中不同字母代表差异显著 ($P<0.001$)

图 2 溶血程度随溶血时间的变化规律

Fig.2 The variation of hemolysis degree with hemolysis time

2.4 对应溶血程度所需时间的 95% 的置信区间

不同溶血程度对应的的时间的 95% 的置信区间见表 2。由表 2 可见, 不同溶血程度对应的溶血时间 (95% 可信区间) 之间并无重叠, 组间差异显著。

表 2 不同溶血程度对应的的时间的 95% 的可信区间

Tab.2 95% confidence interval of time corresponding to different degrees of hemolysis

溶血程度	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级
溶血时间 (95% 可信区间)	19.48~39.74	53.87~73.26	82.31~104.09	103.93~130.86	147.49~173.42

注: 组间比较结果, $P<0.001$, 差异存在统计学意义。

3 讨论

目前国内已经有较多研究分析溶血产生的原因,临床上普遍认为样本溶血是医务人员操作不规范、存放不当、运输不当,以及抽血器具不合格等原因导致的^[14-15]。年龄、性别、民族、疾病类型等献血者因素均可能会对标本溶血造成一定影响,继而影响细胞溶血速度^[16-17]。另有研究表明,标本溶血的原因大多与护士的技术操作不当有关,其次为负压管的检验合格率及标本的运送问题^[18]。

本研究的创新之处在于利用酶标仪检测血清与冻融细胞层不同比例混合后的血清吸光度值来人为建立不同溶血程度分级,后期再根据达到对应溶血程度的时间来探究两者的规律,主要通过对应溶血程度进行数字化来避免肉眼判断的误差。一般女性静脉细弱的情况较为多见,较难穿刺,溶血率更高^[16],但本次实验中男志愿者组与女志愿者组达到相同溶血程度的时间经秩和检验 P 值均大于 0.05,表明男女离体血液溶血速度无显著差异。推断其原因可能是样本量较小,标本运送、存储器皿及抽血操作等均为同一条件,尽可能减小了误差。本研究通过观察离体血液溶血程度随时间的变化来模拟尸体血液溶血随时间的变化。实验中溶血程度随着时间的延长,血清 OD 值增加符合溶血的一般规律,主要是细胞缺氧水肿后破裂,后期还有腐败等因素加重细胞的裂解。另外溶血速度与温度也存在联系,低温下(非冷冻)可降低细胞耗氧量,减轻细胞水肿,减慢细胞破裂。常温下离体抗凝血液溶血程度与溶血的时间具有较好的相关性($r = 0.866, P < 0.05$),因而可以根据不同溶血程度对应的溶血时间(95%的可信区间)来估算死亡时间。不同溶血程度之间存在溶血时间的重合,推断其原因可能为红细胞数量的个体差异,红细胞周期为 120 d,红细胞所在阶段不同,老化红细胞内糖代谢的酶活性都有所降低,所以 ATP 来源明显减少。一些需能反应的酶,如红细胞膜的钠钾泵、钙泵等难以正常行使功能,结果导致红细胞内 Ca^{2+} 增多, K^+ 减少。 Ca^{2+} 在胞内的聚集使膜蛋白交联,细胞变形性降低,细胞变脆,易溶血^[19]。一方面,血管内溶血情况较为复杂,体外溶血无法完全模拟实践中尸体血管内的溶血;另一方面,实践中若血液已凝血,也无法

使用回归方程估算 PMI,故应用于实践还存在一定误差。目前有越来越多的指标可用于死亡时间的推断,但是部分指标的检测成本较高,检测方法较为困难。法医工作者们在实践中可多关注检测方法较为简单、宏观的指标来进行 PMI 和死亡方式等相关内容的推断,便于在基层办案工作的应用。

综上所述,溶血程度与溶血时间存在一定规律及较好的相关性。在法医工作中,死亡时间在 7 天内的尸体,可通过建立溶血程度与死亡时间的回归方程初步估算死亡时间。后期我们将加大样本量进一步进行检测,另外与实际死亡个体进行对比,以期为 PMI 鉴定提供较准确的辅助诊断。

参考文献:

- [1] 王琪,林汉成,徐纪茹,等.死亡时间推断最新研究与展望[J].法医学杂志,2018,34(5):459-467.
- [2] USUMOTO Y,HIKIJ W,SAMESHIMA N,et al.Estimation of postmortem interval based on the spectrophotometric analysis of postmortem lividity[Z].Legal Medicine,2010,12(1):19-22.
- [3] 徐旺,王禹,王嫚,等.螨虫在法医学应用中的研究进展[J].中国法医学杂志,2021,36(5):532-536.
- [4] 马成栋,马孟云,廖信彪.应用黑水虻生长发育规律推断死亡时间 1 例[J].广东公安科技,2021,29(2):57-58.
- [5] ISHIKAWA N,NISHIDA A,MIYAMORI D,et al.Estimation of postmortem time based on aorta narrowing in CT imaging[Z].Journal of Forensic & Legal Medicine,2013,20(8):1075-1077.
- [6] HASEGAWA I,SHIMIZU A,SAITO A,et al.Evaluation of post-mortem lateral cerebral ventricle changes using sequential scans during post-mortem computed tomography [Z].International Journal of Legal Medicine,2016,130(5):1323-8.
- [7] HUNTER M C,POZHITKOV A E,NOBLE P A.Accurate predictions of postmortem interval using linear regression analyses of gene meter expression data[Z].Forensic Science International,2017,275:90-101.
- [8] WOOD P L and SHIRLEY N R.Lipidomics analysis of postmortem interval: preliminary evaluation of human skeletal muscle [J].Journal of Postgenomics Drug & Biomarker Development,2012,3(3):1000127.
- [9] LI C Z,LI Z D,TUO Y,et al.MALDI-TOF MS as a novel tool for the estimation of postmortem interval in

- liver tissue samples [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):4887.
- [10] KOSEOGLU M, HUR A, ATAY A, et al. Effects of hemolysis interference on routine biochemistry parameters [J]. *Croatian Society for Medical Biochemistry and Laboratory Medicine*, 2011, 21(1):79-85.
- [11] 罗宏伟. 标本溶血对生化检验结果的影响[J]. *中国实用医药*, 2020, 15(32):205-206.
- [12] 丁劲峰, 徐国辉, 杨胜昌, 等. 不同死因大鼠死后不同时间红细胞溶血速度比较[J]. *中国法医学杂志*, 2014, 29(5):434-436.
- [13] 米丽, 高卫民, 杜中波, 等. 大鼠过敏性休克死后血清 IgE、类胰蛋白酶的变化[J]. *法医学杂志*, 2015, 31(3):181-184.
- [14] 丁静. 关于影响血液样本检验质量的因素分析及控制措施[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(25):320-321.
- [15] 石玲玲. 标本溶血的原因及防范[J]. *中国社区医师(医学专业)*, 2013, 15(7):318.
- [16] 刘婧, 冯立民, 龚人杰. 标本溶血的患者因素分析及对策探讨[J]. *实验与检验医学*, 2017, 35(1):117-119.
- [17] 何博, 苏玮, 梁雪开, 等. 献血者因素对保存期间红细胞溶血的影响[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(8):1064-1067.
- [18] 谢锦鑫, 陈少清, 曾晓清. 外周静脉血标本溶血的原因分析及研究[J]. *中国卫生标准管理*, 2017, 8(23):143-145.
- [19] 王瑜, 刘兴顺. 红细胞衰老及程序性死亡机制[J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(4):1124-1128.

Preliminary Study on Estimation of Postmortem Interval by Hemolysis Degree

ZHAO Xiaoyun^a, LI Jie^b, SHI Junzhan^a, MA Jingjing^a, ZHOU Lumin^a, YAO Zewei^a, WEI Mingfei^a, LI Fan^a

(a. University of Forensic Medicine; b. Central Laboratory of the Second Affiliated Hospital, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China)

Abstract: To explore the law that the degree of hemolysis of human blood changes with time to estimate the time of death. The elbow venous blood of 23 healthy volunteers aged from 20 to 30 years old were collected by anticoagulant tube. The absorbance(OD) was measured by enzyme meter at an interval of 6 hours at room temperature 25 °C, and the time corresponding to different degree of hemolysis was recorded. The degree of hemolysis of blood samples increased with the prolongation of hemolysis time at room temperature, and there was a linear correlation between hemolysis degree and hemolysis time ($r=0.866$). The regression equation: $y=31.792x+29.739$, there was no difference in hemolysis speed between different sexes. In conclusion, in forensic work, the time of death can be estimated by establishing the regression equation between the degree of hemolysis and the time of death.

Keywords: forensic pathology; inference of time of death; hemolysis

(责任编辑 李维卫)