

骨骼肌 circRNA 在死亡时间推断中的初步筛选及验证研究

董婷婷,肖作润,刘增甲,王业全,张国安,崔文
(济宁医学院 法医学与医学检验学院,山东 济宁 272067)

摘要:目的 通过构建骨骼肌中环状 RNA(circular RNA, circRNA)表达谱,筛选出人体骨骼肌中与死亡时间具有时序性变化的 circRNAs,并对筛选出的 circRNAs 进行验证,进而探讨其相对表达量与死亡时间的相关性。方法 芯片实验选取 2 例外界温度、湿度相对一致,已知死亡时间在 24 h 内的个体,分别于尸检即刻(12 h 以内)、3、5、7、10 d 各取 50 g 组织进行总 RNA 提取,并进行逆转录、探针标记、基因芯片检测等实验,初步得到 circRNA 表达谱;对筛选出的 circRNAs 在后续收集的 18 例检材中进行验证,对所得数据进行统计分析。结果 骨骼肌组织中共检测出 13 156 个 circRNAs,但在 10 d 内整体呈下降趋势的 circRNAs 只有 hsa_circ_0001727、hsa_circ_0001136、hsa_circ_0001871、hsa_circ_0005251、hsa_circ_0000284、hsa_circ_0000520、hsa_circ_0001971 7 个。对所筛选出的 7 个 circRNAs 在 18 例检材中进行验证,发现只有 hsa_circ_0001727、hsa_circ_0001136、hsa_circ_0001871、hsa_circ_0005251、hsa_circ_0000284 5 个 circRNAs 随着死亡时间增加,其相对表达量显著下降,具有统计学意义($P < 0.05$)。而 hsa_circ_0000520、hsa_circ_0001971 2 个 circRNAs 的表达为阴性。结论 circRNA 是一种较为稳定的生物标记物,部分可用于死亡时间推断的研究。

关键词:法医病理学;死亡时间推断;人肋间肌;基因芯片;环状 RNA

中图分类号:DF795.1 文献标志码:A doi: 10.3969/j.issn.1671-2072.2022.01.012

文章编号:1671-2072-(2022)1-0085-08

Preliminary Screening and Verification of Skeletal Muscle circRNA in PMI Estimation

DONG Tingting, XIAO Zuorun, LIU Zengjia, WANG Yequan, ZHANG Guoan, CUI Wen

(Institute of Forensic Medicine and Laboratory Science, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: **Objective** CircRNAs in human skeletal muscle with temporal changes in death time were screened by constructing circular RNA (circRNA) expression profiles in skeletal muscle. The selected circRNAs were further verified, and then the correlation between the relative expression and the time of death was investigated. **Methods** In the chip experiment, 2 individuals with relatively uniform external temperature and humidity, and known to have a death time of less than 24 hours, were taken for 50 g each at the autopsy (within 12 hours), 3 days, 5 days, 7 days, and 10 days. The RNA was extracted, and then reverse transcription, probe labeling, and gene chip detection were performed to obtain the expression profile of circRNA. The selected circRNAs were verified in 18 samples collected in the subsequent samples, and the obtained data were statistically analyzed. **Results** A total of 13156 circRNAs were detected in skeletal muscle tissue, but the total number of circRNAs that showed a downward trend within 10 days was only hsa_circ_0001727, hsa_circ_0001136, hsa_circ_0001871, hsa_circ_0005251, hsa_circ_0000284, hsa_circ_0000520, hsa_circ_0001971 and so on. The 7 circRNAs screened were verified in 18 samples, and only 5 circRNAs such as hsa_circ_0001727, hsa_circ_0001136, hsa_circ_0001871, hsa_circ_0005251, hsa_circ_0000284, etc., with the increase of death time, the relative expression decreased significantly

and statistically ($P < 0.05$). The expression of two circRNAs, hsa_circ_0000520 and hsa_circ_0001971, was negative.

Conclusion circRNA can be used as a more stable biomarker for the study of death time inference.

Keywords: forensic pathology; PMI estimation; human intercostal muscle; gene chip; circular RNA

收稿日期:2019-08-15

基金项目:国家级大学生创新训练计划项目(201710443001);
济宁医学院教师科研扶持基金(JY2017FY003);校级大学生
创新训练计划项目(cx2017001)。

作者简介:董婷婷(1990—),女,硕士,主要从事法医病理学
研究。E-mail:jnyxydong@163.com

通信作者:刘增甲(1982—),男,副主任法医师,硕士,主要从
事法医病理学研究。E-mail:lzjia001@163.com

死亡时间或死后间隔时间(postmortem interval, PMI)是指尸体被发现时距离死亡时的时间间隔。死亡时间的准确推断在可疑死亡案件中,对于排查和确定犯罪嫌疑人至关重要。因此,死亡时间的推断研究一直是法医学研究的热点,也是目前研究的难点。传统的法医病理是通过尸斑、尸僵、尸温等尸体现象的变化推断死亡时间,但因其易受外界环境因素的影响,造成死亡时间的推断误差较大。因此,寻找准确推断死亡时间的方法对于法医实践中的应用至关重要。

近年来,利用 RNA 的降解程度来推断死亡时间已逐渐成为法医学研究热点。LI W 等^[1]发现在大鼠的心肌组织中,线性 RNA 在死后的 96 h 内呈现平稳增高的趋势,适合用于 PMI 推断。但是国内学者吕叶辉等^[2]研究发现大鼠心肌内多种线性 RNA 的表达受死亡原因的影响,且 RNA 易降解,增加了其提取和检测的困难,并不适合进行推广应用。

环状 RNA(circular RNA, circRNA)是一类以共价键形成的闭合环状结构的非编码 RNA 分子,不具有 5' 端帽子结构和 3' 端 poly A 尾。RNase R 可以识别线性 RNA 游离的 3' 端,从而对其进行降解,而 circRNA 由于其环状结构,并不能被 RNase R 所识别,故与传统线性 RNA 相比,其具有更高的稳定性。本实验利用其稳定性这一特点,以期筛选出

与死亡时间具有相关性的 circRNA,用于法医实践中对死亡时间的推断。

1 材料与方法

1.1 样本

从济宁市公安局和济宁医学院司法鉴定中心收集 18 例死亡时间在 24 h 以内的个体并提取其肋间肌。入选标准:(1)死亡时间在 24 h 以内,直至尸体被剖验时为常温保存;(2)排除遗传性疾病及其他免疫性疾病和恶性肿瘤,以防影响 circRNA 表达量检测的准确性;(3)尸体均为交通意外或刑事案件受伤后死亡,取材部位无损伤(表 1)。每例均详细记录其死亡时间、死因、年龄、性别等资料。然后放置在人工气候箱内,模拟外界环境(温度 18℃,湿度 60%),首先从济宁市公安局的刑事案件中心收集芯片实验选取 2 例,皆因外伤死亡,已知死亡时间在 24 h 以内,分别于尸检即刻(12 h 以内)、3、5、7、10 d 各取 50 g 肋间肌进行实验,用于制作 circRNA 表达谱。后期收集的 18 例分别在尸检即刻(12 h 以内)、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d 等时间点定点取样,并立即置于液氮中冻存,最后统一进行总 RNA 提取,并进行后续实验。收集到的上述样本经济宁医学院伦理委员会审查批准,且符合相关规定。

表 1 样本个体详细信息表

编号	性别	年龄/岁	死亡原因	PMI / h	环境温度/℃
1	男	14	重度颅脑损伤	8	18
2	男	35	窒息死亡	10	18
3	男	61	窒息死亡	15	17
4	男	55	重度颅脑损伤	19	17
5	女	52	心、肺损伤	19	17
6	男	36	心脏破裂	22	16
7	男	32	重度颅脑损伤	24	15
8	男	84	重度颅脑损伤	8	15
9	男	63	肝脾破裂	10	18
10	男	62	重度颅脑损伤	20	18
11	男	85	窒息死亡	24	19
12	女	47	心、肺损伤	18	19
13	男	64	严重肺挫伤	6	19
14	女	60	肝、脾破裂	23	18
15	男	54	重度颅脑损伤	5	18

续表1

编号	性别	年龄/岁	死亡原因	PMI / h	环境温度/℃
16	女	45	肝、脾破裂	5	17
17	女	43	重度颅脑损伤	7	17
18	男	56	重度颅脑损伤	10	18

1.2 方法

1.2.1 基因芯片实验

本实验由上海康成生物有限公司协作完成,主要实验步骤包括:

(1)样本 RNA 抽提:采用 Tri20L 进行 RNA 提取 (Invitrogen);(2)RNA 质量检测:测 OD 值计算浓度并评估纯度 (OD_{260/280} 在 1.8~2.0 之间),琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度及完整性;(完整性比较好的总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图呈现 3 条带,且 3 条带清晰无严重拖尾);(3)使用 RNase R (Ribonuclease R,核糖核酸外切酶)(吉赛生物,R0301)消化线性 RNA 分子;(4)使用逆转录试剂将去除线性 RNA 的 RNA 反转录为带有 T7promoter 的 cDNA 序列,然后再将 cDNA 转录成带有荧光标记的 cRNA 序列;(5)标记效率质量检测:使用 Nanodrop 检测荧光标记效率;(6)芯片杂交:在标准条件下将标记好的探针和高密度基因组芯片进行杂交;(7)图像采集和数据分析:使用 GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片的荧光强度,并将实验结果转换成数据型数据保存。

1.2.2 具有显著差异表达的 circRNAs 的筛选

采用 P 值小于 0.05 ($P < 0.05$)、差异表达倍数绝对值大于等于 2 ($|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 2$) 筛选出具有显著差异的 circRNA;将差异 circRNA 进行 STEM 分析,进一步筛选出整体为下降趋势的 circRNA;将上述筛选的 circRNA 进行热图分析,最终筛选出随死亡时间的增加,相对表达量具有显著差异的 circRNAs。

1.2.3 引物设计

通过 circbase 数据库 (<http://www.circbase.org/>) 获得 circRNA 的序列,若序列太长则取首尾各 150 bp 进行拼接,末尾 150 bp 作为拼接后的首序列,将该 300 bp 序列用 primer-blast 进行引物设计,具体参数根据引物设计原则进行设置,然后选择引物 (circRNA PCR 产物必须包含首位拼接位点)。若有已报道 circRNA 引物,则采用文献中引物。

1.2.4 内参基因选择

在样品处理过程中, RNA 水平的轻微变化都可以导致靶基因相对表达量的趋势改变,而降解组织中又不存在合适且稳定的参考基因。大量数据表明 miRNA 在死后组织中较为稳定,进一步研究发现 mir-133a 作为参考标志物为最佳。因此,本研究对常用 GAPDH、 β -Actin、mir133a-3p 的稳定性进行研究,以筛选出最佳参考基因。

1.2.5 实时荧光定量 RCR

本研究中 Ct 值范围在 15~35 之间,每个样本做 3 个复孔,复孔间 Ct 值 STD < 0.2。

(1)取备检组织样本采用 trizol (Invitrogen 公司) 法提取总 RNA,按说明书操作。然后进行电泳检测其降解程度。用 NanoDrop2000c 紫外可见分光光度计检测其纯度及浓度。采用 mRNA 反转录试剂盒 (TAKARA 公司),将 RNA 反转录为 cDNA 第一链,然后放置在 -80℃ 下备用。(2)将上述的 cDNA 样本,应用 TB Green Premix Ex Taq II (TAKARA 公司),在 QuantStudio 7 Flex 实时荧光定量 PCR 仪系统上进行检测,反应总体积 20 μ L;反应程序参数:预变性 95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 30 s 共 40 个循环。溶解曲线步骤:95℃ 5 s;60℃ 1 min;95℃ 15 s;冷却温度 50℃ 30 s。

1.3 统计分析

以 ΔCt 等于目的基因的 CT 值减去内参基因的 CT 值, $\Delta \Delta \text{Ct}$ 为不同死亡时间的 ΔCt 减去死亡当天 (12 h 以内) 的 ΔCt 所得,以 $2^{-\Delta \Delta \text{Ct}}$ 代表目标 circRNA 在不同时间点相对死亡当天 (12 h 以内) 的差异表达倍数。应用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 进行描述。两个时间点之间的结果进行比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 芯片实验结果

火山图 (图 1) 由 $\log_2(\text{FC})$ 及 $-\lg(P \text{ 值})$ 所组成,

水平线代表 P 值,垂直线代表相对表达量上调或下调 2 倍。图中的红点代表具有显著差异的 circRNAs。将第 3、5、7、10d 的结果与死亡当天(12h 以内)相比,第 3 天具有差异表达的 circRNAs 数目最多。

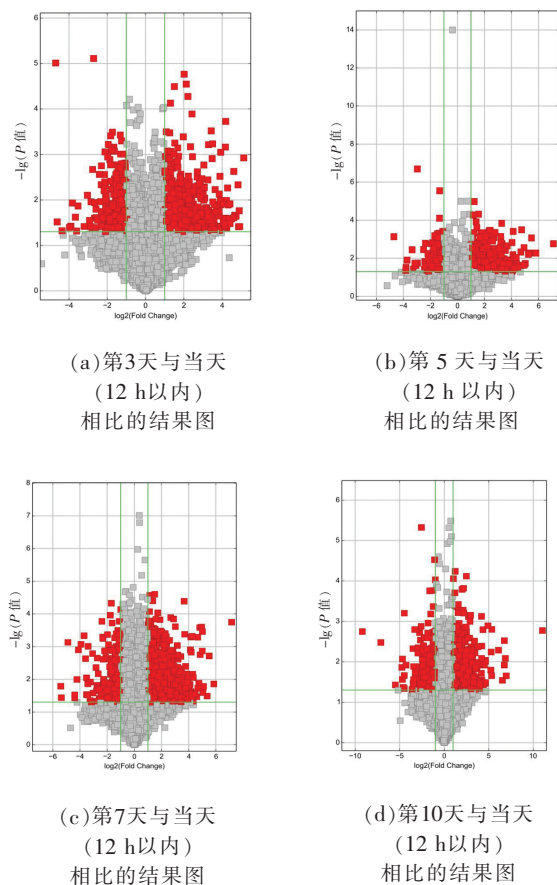


图1 火山图

2.2 基因芯片筛选结果

STEM 分析结果发现部分 circRNAs 相对表达量表现为先上升、后下降的趋势(图 2),部分 circRNA 则一直呈下降趋势(图 3)。

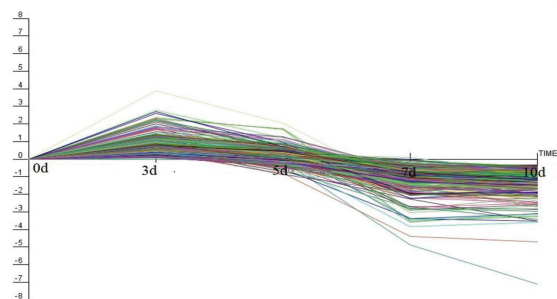


图2 芯片结果中具有随死亡时间的进行,其相对表达量先升高再降低的基因簇

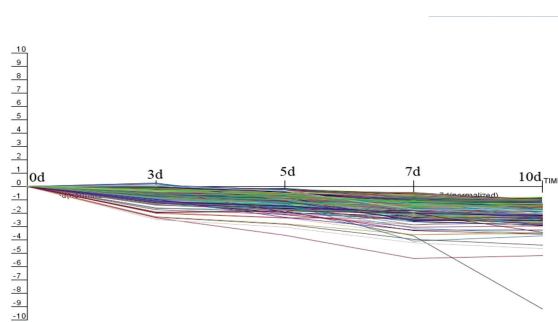


图3 芯片结果中具有随死亡时间的进行,其相对表达量降低的基因簇

2.3 热图聚类分析

热图分析结果显示为四个部分:热图、横轴和纵轴、色键。横轴为样本,纵轴为基因名称,热图中每一个小格代表一个基因,颜色则表示为该基因的表达量。色键即用于查看基因表达量的对比键,红色代表高表达量,绿色代表低表达量。实验结果展示了表达量具有显著差异的 circRNAs(图 4)。

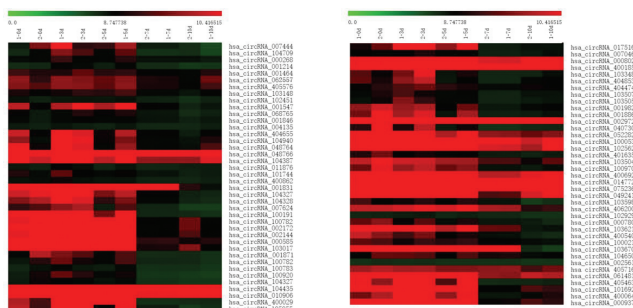


图4 具有差异表达的 circRNA 聚类图

2.4 差异表达基因的筛选

对热图分析筛选出的具有相同变化趋势的 circRNAs 进行进一步分析,随死亡时间推移,在 10 d 内整体呈下降趋势的 circRNAs 有 hsa_circ_0000284、hsa_circ_0001136、hsa_circ_0001727、hsa_circ_0005251、hsa_circ_0001871、hsa_circ_0001946、hsa_circ_0001971 7 个,具体信息如表 2。

2.5 结果

2.5.1 引物序列信息

根据设计及查找所得序列如表 3。

2.5.2 琼脂糖凝胶电泳结果

根据引物序列进行 PCR 实验后,电泳结果显示每对引物特异性良好,均表现出单一条带,且无二聚体产生,引物可用于后续实验(图 5)。

表2 随死亡时间表达下调的 circRNAs

编号	circbase	circRNA	P-value	FC (abs)	Regulation
1	hsa_circ_0000284	hsa_circRNA_100782	0.002 8	2.700 5	down
2	hsa_circ_0001136	hsa_circRNA_103017	0.011 2	6.453 5	down
3	hsa_circ_0001727	hsa_circRNA_104435	0.000 6	6.493 8	down
4	hsa_circ_0005251	hsa_circRNA_104328	0.002 9	7.742 3	down
5	hsa_circ_0001871	hsa_circRNA_001871	0.018 2	3.339 6	down
6	hsa_circ_0001946	hsa_circRNA_105055	0.013 3	4.566 7	down
7	hsa_circ_0001971	hsa_circRNA_104327	0.010 6	5.015 4	down

注: circbase为circRNA在circbase数据库中的别名, circRNA为其标准化命名, P-value为P值, FC为差异表达倍数, Regulation为差异表达量的变化趋势。

表3 引物序列

circRNA	引物序列	产物长度/bp
hsa_circ_0000284 F	GTCGGCCAGTCATGTATCAA	169
hsa_circ_0000284 R	TGGAATACACAACTGCTTGGC	
hsa_circ_0001136 F	GGACTTCCCCTCTCGCATG	176
hsa_circ_0001136 R	TCCTTCTGCCTCTATGACCTG	
hsa_circ_0001727 F	CCTCGAGCTTTGACCTTCATCACG	132
hsa_circ_0001727 R	CTCACCTTTATGTCCTGGGAGGT	
hsa_circ_0005251 F	GTCAAATTTGTCAAGGTTGA	114
hsa_circ_0005251 R	AAGATGTTTCTGGTAATGTC	
hsa_circ_0001871 F	ATCCTACCCAAAAGAATGTTT	137
hsa_circ_0001871 R	CAGAGCTTTCATTTCTTGTG	
hsa_circ_0001946 F	ACCCAGTCTTCCATCAACTG	121
hsa_circ_0001946 R	GACACAGGTGCCATCGGA	
hsa_circ_0001971 F	GCTGCCTTAACTTACATGCCC	159
hsa_circ_0001971 R	ACTTTGTGGCTCCTGGATAACT	
GAPDH F	GGGAAACTGTGGCGTGAT	299
GAPDH R	GAGTGGGTGTCGCTGTTGA	
mir133a-3p F	GCCTTTGGTCCCCTTCAAC	70
mir133a-3p R	TATGCTTGTTCCTCTCTGTGTC	
β -Actin F	CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	268
β -Actin R	GCTGTCACCTTCACCGTTCC	

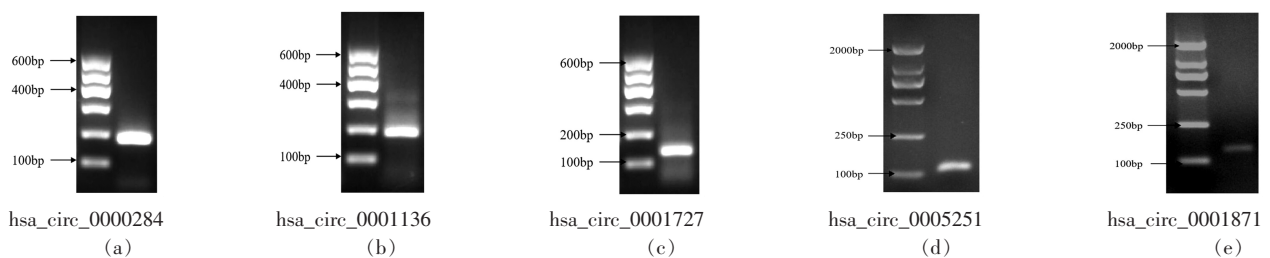
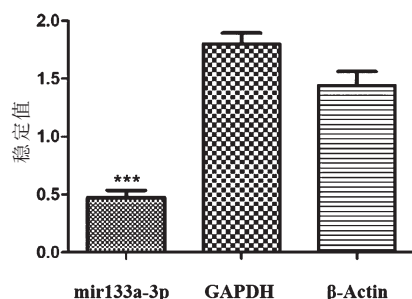


图5 电泳图

2.6 内参基因的选择

根据 NormFinder 软件筛选,结果发现 mir133a-3p 为在骨骼肌中最稳定的内参基因($n=18$, mir133a-3p vs GAPDH、mir133a-3p vs β -Actin, *** $P<0.001$) (图6)。

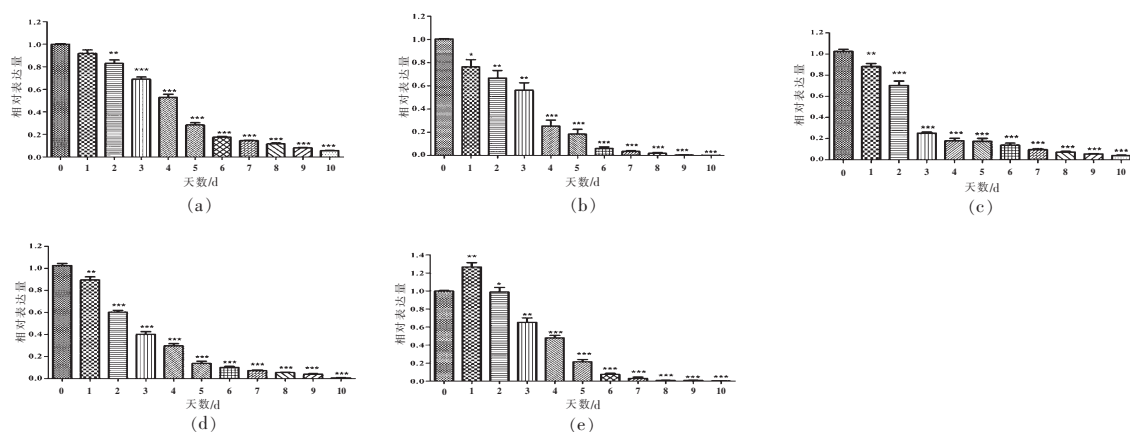


(注:图6横轴为不同内参基因,纵轴为表达稳定值,NormFinder软件用于筛选内参稳定性内参基因的判定标准为表达稳定值最小的基因为最适合的内参基因。由图2可见,mir133a-3p为最稳定的内参基因。)

图6 不同内参基因稳定性分析结果

2.7 各目的基因的相对表达量随死亡时间的变化

根据所筛选基因进行 Q-PCR 实验,结果发现与死亡当天(12 h 以内)相比,在 10 d 内整体呈下降趋势的基因有 5 个,分别为 hsa_circ_0000284、hsa_circ_0005251、hsa_circ_0001727、hsa_circ_0001136、hsa_circ_0001871($n=18$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$) (图7)。



(a: hsa_circ_0000284 的相对表达量随死亡时间的增加而显著下降; b: hsa_circ_0001136 的相对表达量随死亡时间的增加而显著下降; c: hsa_circ_0001727 的相对表达量随死亡时间的增加而显著下降; d: hsa_circ_0005251 的相对表达量随死亡时间的增加而显著下降; e: hsa_circ_0001871 的相对表达量随死亡时间的增加呈先上升后下降的趋势)

图7 各目的基因的相对表达量随死亡时间的变化

3 讨论

因 circRNA 具有组织特异性及高度稳定性,目前在肿瘤、衰老、炎症等方面研究较多,成为当今研究的热点。MENCZAK 等^[3]研究证实 circRNA 具有一定的组织、时序和疾病特异性,且对 RNase R 具有较强的耐受性,不易受其降解。FU 等^[4]研究发现 hsa_circ_0005986 可以与 miR-129-5p 结合,起到 miR-129-5p 海绵作用,从而抑制肝癌的发生,成为肝癌新的生物标志物。DU 等^[5]发现 circ-Foxo3 可通过抑制蛋白的抗衰老作用,使心肌细胞快速衰老。

circRNA 虽在多个领域的研究获得突破,但其在法医学方面进行应用研究的报道极为少见^[6],尤其是利用其结构稳定性、序列保守性及细胞或组织特异性表达等进行的相关研究。赵禾苗等^[7]根据 circRNA 表达的组织特异性,选取了两个 circRNAs 进行实验,发现其在唾液、阴道分泌物、精液中广泛存在,但具体的组织特异性 circRNA 分子,仍在进一步的探索中。死亡时间推断一直以来是法医学研究的热点及难点。截至目前,虽已有多种死亡时间的推断方法,但均易受外界环境因素的影响,导致推断结果出现较大误差,严重影响案件的开展。故此,法医实践工作中急需寻找一种准确推断死亡时间的方法。本研究利用 circRNA 的结构稳定性、序列保守性及细胞或组织特异性表达等特点,查找表达量高,稳定性强,表达量与死亡时间的变化呈一定规律的 circRNA,为在法医实践中准确推断死亡时间提供重要的参考依据。

肌肉组织是人体中最丰富的组织,在被皮肤较好保护的同时又容易提取^[8]。与内脏和神经组织相比,骨骼肌在死后变化方面有较大的延迟,但其分解速度仍比软骨和骨骼要快^[9]。因此,肌肉组织宜于在法医实验室进行常规分析,是推断中晚期死亡时间的一个常见候选组织^[10]。本研究选用了分布范围较广,有肋骨保护,且与机体内外充分接触的肋间肌作为研究对象进行死亡时间推断研究。结果表明肌肉组织可用于中晚期死亡时间推断研究。

本实验应用了实时荧光定量 PCR 技术检测 circRNA 含量,因其灵敏度高、设备使用范围广、分析方法商业化等优点被认为是检测 RNA 的一种良好方法^[11]。此外,实时荧光定量 PCR 结果的准确性很大程度上取决于内参指标的标准化,选取稳定的内参指标可以排除个体差异带来的误差,使统计结果更加客观、准确。对于人体样本,找到合适的内参指标用于 RNA 表达水平的准确定量至关重要。

已有报道称在小鼠骨骼肌组织中 miR-133a 和 circAFF1 较为稳定^[12]。通过查找小鼠 mir-133a 序列,发现人 miR-133a-3p 为其同源序列。通过研究发现在降解的肌肉组织中,miR133a-3p 与常用的 GAPDH、 β -Action 相比,较为稳定,适合作为该实验内参基因。

基因芯片技术作为一种先进的、大规模、高通量检测技术,具有以下几个方面的特点:一是高度的灵敏性和准确性;二是快速简便;三是可同时检测多种基因。每一个 circRNA 对应一个剪接点探针,能准确可靠地检测单一 circRNA,即便在对应线性 RNA 存在的情况下也具有高特异性。circRNA 芯片目前涵盖了人和小鼠的 circRNA 位点。本研究通过 circRNA 芯片筛选得到了较多的 circRNA,更有利于对 circRNA 差异表达谱进行全面、准确的分析。通过筛选最终发现 hsa_circ_0000284、hsa_circ_0001136、hsa_circ_0001727 等 7 个与死亡时间具有负相关性的 circRNAs。但在后续的验证实验中发现只有其中五个 circRNAs 相对表达量随死亡时间变化具有显著差异,分别为 hsa_circ_0000284、hsa_circ_0001136、hsa_circ_0001727、hsa_circ_0005251、hsa_circ_0001871,但 hsa_circ_0001871 表现为先上升后

下降的趋势,提示只有部分的 circRNA 降解具有稳定的规律性变化,可根据其降解速度进行死亡时间的推断。

目前,circRNAs 相对表达量上升或下降的机理并不明确。在正常生理情况下,JECK 等^[13]将 circRNA 的形成机制总结为“套索驱动环化”模型,及“内含子配对驱动环化”模型,circRNA 来源于外显子跳跃(exonskipping)事件,其会产生一个包含外显子的套索结构(exon-containing lariat),然后再经过内部拼接成一个由外显子组成的 circRNA。由此可见,任何外显子跳跃事件都具有形成 circRNA 的潜能,同时长侧翼(long flanking introns)及丰富的 ALU 重复序列都会增加其环化的能力。LASDA 等^[14]研究认为,circRNA 的降解机制或许和胞外囊泡共沉淀有关,circRNA 通过囊泡作用运输到胞外,然后胞外囊泡被其他细胞吸收,从而使得 circRNA 被降解。但也有研究发现,作为 RNA 编辑因子(RNA-editing factor)的 ADAR1 对有外显子环化来源的 circRNA 具有抑制作用,敲除其所在位置的基因发现,部分 circRNA 的表达量有所上升^[15]。部分 circRNA 也可作为内源竞争性 RNA 在体内被小干扰 RNA (Small interfering RNA; siRNA) 所降解。最新的研究表明 m6A 可以识别蛋白 YTHDF2 结合靶分子,募集 HRSP12,进而介导 RNA 内切核酸酶 RNase P/MRP 复合物切割靶分子,而这一过程可以作用于 mRNA 和 circRNA^[16]。由此可见,对于 circRNA 的降解机制,目前仍没有统一明确的解释,仍需进一步研究探讨。

本实验中也同时发现,部分 circRNA 分子表达量的变化与死亡时间无相关性,如 hsa_circ_0001946、hsa_circ_0001971,考虑或许是其受外界其他环境因素的影响所致,后续将继续增加样本数量,设置更多变量,寻找更加稳定的 circRNA 分子,以建立更加科学的数学模型,达到准确推断死亡时间的最终目的,从而为死亡时间的推断开辟一条新的路径。

本实验筛选出了 5 个随死亡时间延长呈稳定下降趋势的 circRNAs,可用于死亡时间的推断研究。circRNA 的稳定性使其在陈旧、腐败降解检材的检测中具有巨大优势,可以作为新兴的法医鉴定分子标记使用。

参考文献:

- [1] LI W C, MA K J, LV Y H, *et al.* Postmortem interval determination using 18s-rRNA and microRNA[J]. Science & Justice, 2014,54(4):307-310.
- [2] 吕叶辉,张恒,潘晖,等. 不同死因大鼠心肌内多种 RNA 相对表达量变化与 PMI 的关系[J]. 法医学杂志,2014,30(1):7-12.
- [3] MENCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. Nature, 2013,495(7441):333-338.
- [4] FU L, CHEN Q, YAO T, *et al.* Hsa_Circ_0005986 inhibits carcinogenesis by acting as a miR-129-5p sponge and is used as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2017,8(27):43878-43888.
- [5] DU W W, YANG W, CHEN Y, *et al.* Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses [J]. European Heart Journal, 2016,38(18):1402.
- [6] 杨幸怡,李文怡,许文宁,等. 环状 RNA 在法医学中的应用[J]. 中国法医学杂志,2016(3):268-270.
- [7] 赵禾苗,林清峦,陈静,等. CircRNA 应用于体液斑鉴定的技术可行性研究[J]. 中国法医学杂志,2018(1):31-34.
- [8] PITTNERS E B, MONTICELLI F C. Postmortem muscle protein degradation in humans as a tool for PMI delimitation[J]. International Journal of Legal Medicine, 2016,130(6):1547-1555.
- [9] VASS AA STACY-ANN B, GARY S. Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval[J]. Journal of Forensic Sciences, 2002,47(3):542-553.
- [10] LI C, MA D, DENG K, *et al.* Application of MALDI-TOF MS for estimating the postmortem interval in rat muscle samples[J]. Journal of Forensic Sciences, 2017,62(6):1345-1350.
- [11] ARYA M S I, WILLIAMSON M. Basic principles of real-time quantitative PCR[J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2005,5(2):209-219.
- [12] TU C, DU T, SHAO C, *et al.* Evaluating the potential of housekeeping genes, rRNAs, snRNAs, microRNAs and circRNAs as reference genes for the estimation of PMI[J]. Forensic Science, Medicine, and Pathology, 2018,14(2):194-201.
- [13] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, *et al.* Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with alu repeats[J]. RNA-a Publication of the RNA Society, 2013,19(2):141-157.
- [14] LASDA E, PARKER R. Circular RNAs co-precipitate with extracellular vesicles: a possible mechanism for circRNA clearance[J]. PLoS One, 2016,11(2):e0148407.
- [15] RYBAK W, AGNIESZKA A, STOTTMEISTE R, *et al.* Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. Molecular Cell, 2015,58(5):870-885.
- [16] PARK O H. Endoribonucleolytic cleavage of m6a-containing RNAs by RNase P/MRP complex[J]. Molecular Cell, 2019(19):30145.

(本文编辑:张素华)