

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001825

唾液斑口腔上皮细胞端粒长度变化 在法医学实践中的应用研究

官琦, 幸宇, 甘丽, 陈晓丽, 邓世雄

(重庆医科大学基础医学院法医学与生物医学信息研究室, 重庆 400010)

【摘要】目的:探讨人类唾液斑中口腔上皮细胞端粒长度变化与年龄的相关性及其稳定性,探讨 2 种方式提取的检材及其不同放置时间后口腔上皮细胞端粒长度是否有差异,拟为法医学通过微量易得检材推断年龄提供依据。**方法:**选取 40 例不同年龄段健康人唾液,分为童年组(0~6 岁)、少年组(7~17 岁)、青年组(18~40 岁)、中年组(41~65 岁)、老年组(>66 岁)5 个年龄组,每组 8 人,分别制成新鲜口腔拭子和不同时间段(1、7、14、28 d)的唾液斑,用磁珠法提取样本中的 DNA,通过荧光 PCR(聚合酶链反应)相对定量法检测端粒 DNA 限制性酶切段长度变化。**结果:**不同组间端粒长度有明显差异($F=7.138, P=0.018$),年龄回归方程: $Y=-75.006X+101.193$,端粒 TRF 平均长度随年龄增加而逐渐缩短,并呈不均衡趋势。检材提取方式及检材新旧程度对检测到的 TRF 结果没有显著影响($P=0.740, P=0.740, P=0.958, P=0.324$)。**结论:**唾液斑中口腔上皮细胞端粒长度随年龄增加而缩短,并且呈规律性改变;2 种方式采集的样本及其不同放置时间后的样本端粒长度无明显差异,说明唾液斑中口腔上皮细胞端粒长度具有一定的稳定性,故可通过唾液斑中口腔上皮细胞端粒长度推断个体年龄。

【关键词】法医物证学;唾液斑;年龄推断**【中图分类号】**R89**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-03-19

Application of telomere length of oral epithelial cells of saliva spot in forensic practice

Guan Qi, Xing Yu, Gan Li, Chen Xiaoli, Deng Shixiong

(Teaching and Research Section of Forensic and Bioinformatics, College of Basic Medicine,
Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the relationship and stability between age and telomere length of oral epithelial cells of saliva spot, and to discuss whether freshness of sample or sample collected by two methods affects the length change, in order to provide forensic science with evidence to deduce age by means of micro-sample. **Methods:** Forty fresh saliva samples were collected from healthy individuals, which was divided into five groups, aged from 0 to 100 years old. Those saliva samples were made into fresh oral swabs and saliva spots at different periods(1, 7, 14, 28 d). DNA was extracted by paramagnetic particle method and the terminal restriction fragment length was measured by quantitative polymerase chain reaction with the analysis of linear regression. **Results:** The average TRF length showed a shortening tendency with aging, while samples collected by two methods and freshness of sample did not affect this parameter. The regression equation for age estimation was $Y=-75.006X+101.193$. **Conclusion:** The terminal restriction fragment length and age of donors show an inverse correction and there is no difference in samples collected by two methods and freshness of sample possible to infer individuals age by terminal restriction fragment length assay.

【Key words】forensic genetics; saliva spot; age estimation

端粒是短的多重复的非转录序列(TTAGGG)及一些结合蛋白组成的特殊结构,除了提供非转录

DNA 的缓冲物外,还能保护染色体末端免于融合和退化,在染色体定位、复制、保护和控制细胞生长及寿命方面具有重要作用,并与细胞凋亡、转化和永生密切相关^[1]。大量文献已经证实端粒长度变化与疾病^[2-5]、衰老^[1]、肥胖^[6]等多种因素相关,且组织端粒长度变化在组织中没有特异性。法医物证学所研

作者介绍:官琦, Email: 1164193517@qq.com,

研究方向:法医物证学。

通信作者:邓世雄, Email: dengshixiong1963@163.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180704.1249.030.html>
(2018-07-05)

究的样本通常为唾液、血液以及精液等易得检材,已有研究证实血液中白细胞端粒长度与年龄推测相关^[7-9]。相比血液,唾液样本具有无创性、简便性,其形成的唾液斑可使 DNA 稳定存在,且案发现场易得^[10]。考虑到唾液的易得性,唾液斑制作的简便性,本研究选取唾液斑口腔上皮细胞端粒长度作为检测指标,考察唾液斑口腔上皮细胞端粒长度与年龄的相关性及稳定性,两种采集方式提取的样本之间端粒长度是否变化。

1 材料与方法

1.1 唾液斑和口腔拭子的采集

在重庆地区随机选取 40 例健康人群,分为童年组(0~6 岁)、少年组(7~17 岁)、青年组(18~40 岁)、中年组(41~65 岁)、老年组(>66 岁)5 个年龄组,每组各 8 例,男女各半,均排除肿瘤、内分泌、遗传性疾病,分别制作成唾液斑及口腔拭子,合计 110 个样本。分为 3 个实验组,实验 1 采用老年组和少年组,组内唾液斑和口腔拭子各 8 份,每组样本共 16 份;实验 2 采用幼儿组和少年组,样本为唾液斑(1、7、14、28 天),每组 8 人,各 32 份;实验 3 采用幼儿组、少年组、青年组、中年组和老年组 5 组进行实验,样本为 1 d 的唾液斑,每组各 8 份。采集前 30 min 内无进食、进水。口腔拭纸采集方式:用医用棉签刮拭双颊内侧数十次,干燥待用;唾液斑采集方式:被采集者随机吐唾液于滤纸上,干燥后形成唾液斑待用。口腔拭子和唾液斑需保存于干燥处。分别存放 1、7、14 及 28 d。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用磁珠法(天根生化有限公司试剂盒)提取唾液口腔上皮细胞 DNA,操作严格按照说明书进行。紫外分光光度计检测其浓度和纯度,选取纯度介于 1.6~2.0 的样本作为实验品。

1.3 qRT-PCR 法测口腔上皮细胞 DNA 端粒长度 采用 PCR 反应分别扩增端粒和 36B4 基因。

1.3.1 引物序列 端粒及 36B4 的引物设计参照文献^[11]。端粒:Tel1:5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-GAGGGT-3';Tel2:5'-TCCCCACTATCCCTATCCCTATCCC-TATCCCTATCCCTA-3'。36B4:Forward:5'-CAGCAAGTGG-GAAGGTGTAATCC-3';Reverse:5'-CCCATTCTATCATCAA-CGGGTACAA-3'。

1.3.2 标准品的制备 将提取到的人唾液口腔上皮细胞 DNA 稀释至 10 ng/mL,各取 2 mL 混匀分装作为标准品,用 TE 缓冲液按 1:3 倍稀释为 10.000、3.333、1.111、0.370、0.123 ng/mL 的 5 个梯度,以此作为标准曲线的 5 个点。

1.3.3 端粒和 36B4 的 PCR PCR 样品分为两部分,第一部分是检测样品端粒长度 PCR 扩增 C_t 值,第二部分是检测内参 36B4 基因 PCR 扩增 C_t 值。目的基因 DNA 和内参基因 DNA 各做 3 个复孔,PCR 反应体系以及条件如表 1。端粒长度荧光实时定量 PCR 检测采用 Bio-Rad 序列检测系统,并用该系统采集分析数据,公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 决定端粒/36B4(T/S)比率, $\Delta C_t = \Delta C_{t(\text{telomere})} - \Delta C_{t(36B4)}$,相对 T/S 比率 $= 2^{-(\Delta C_{t1} - \Delta C_{t2})} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

表 1 反应体系

组成成分	10 μ L 体系
2 $\times$ SuperReal PreMix Plus	5 μ L
正向引物(10 mol/L)	0.3 μ L
反向引物(10 mol/L)	0.3 μ L
DNA(deoxyribonucleic acid)模板	1 μ L
RNase-free ddH ₂ O	3.4 μ L

1.4 统计学分析

实验数据统计分析应用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间计量资料的比较采用 t 检验,多组间计量资料的比较采用方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同样本处理方式对端粒长度结果的影响

抽取少年组及老年组样本检测端粒长度:少年组唾液斑平均端粒长度为 0.97 ± 0.08 ,口腔拭子平均端粒长度为 0.96 ± 0.07 ;老年组唾液斑平均端粒长度为 0.54 ± 0.30 ,口腔拭子平均端粒长度为 0.58 ± 0.50 。将提取的同一年龄组唾液斑平均端粒长度与口腔拭子平均端粒长度值($\Delta\Delta C_t$)进行比较(配对设计)。结果显示:不同提取方式对结果没有影响、差异。初步显示老年组与少年组唾液斑端粒长度存在差异(图 1,表 2)。

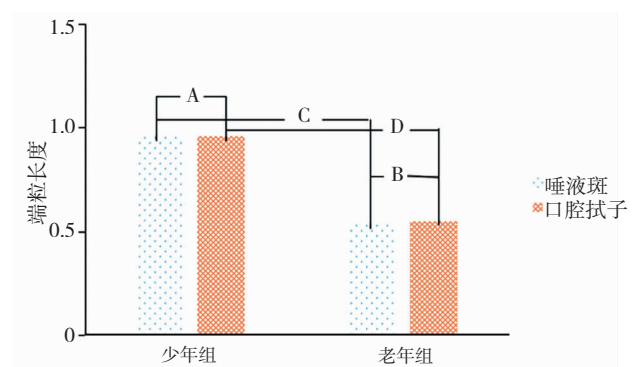


图 1 荧光 PCR 检测唾液斑与口腔拭子(少年组、老年组)平均端粒长度值

注:少年组唾液斑平均端粒长度为 0.97 ± 0.08 ,口腔拭子平均端粒长度为 0.96 ± 0.07 ;老年组唾液斑平均端粒长度为 0.54 ± 0.3 ,口腔拭子平均端粒长度为 0.58 ± 0.5 ;A 表示 $P(\text{少年组组间})=0.591>0.05$;B 表示 $P(\text{老年组组间})=0.706>0.05$;C 表示 $P(\text{两组间唾液斑})<0.0001$;D 表示 $P(\text{两组间口腔拭子})<0.0001$ 。

表 2 检测两组的平均端粒长度值 (少年组与老年组)

组别	样本类型	平均端粒长度	t 值	P 值
少年组	唾液斑	0.97 ± 0.08	1.007	$P_1=0.59$
	口腔拭子	0.96 ± 0.07	1.014	$P_2=0.70$
老年组	唾液斑	0.54 ± 0.30	0.393	$P_3<0.01^a$
	口腔拭子	0.55 ± 0.50	0.405	$P_4<0.01^a$

注: P_1 : 少年组内比较; P_2 : 老年组内比较; P_3 : 两组间唾液斑比较; P_4 : 两组间口腔拭子比较; a 表示 $P_3=0.0001$; $P_4=0.0001$

2.2 检材新旧程度对唾液斑细胞端粒长度的影响

抽取少年组与幼儿组样本检测端粒长度: 将同一年龄组测得的不同时间段 (1、7、14、28 d) 唾液斑口腔上皮细胞端粒长度值 ($\Delta\Delta C_t$) 进行比较。结果显示: 少年组和幼儿组间端粒长度有统计学差异, 组内样本间陈旧程度对结果没有影响 (表 3、图 2)。

表 3 不同放置时间唾液斑 (幼儿组和少年组) F 值与 P 值

组别	时间段	端粒长度	F 值	P 值
少年组	1 d	0.95 ± 0.20	$F_{\text{组间}}=4.853$	$P_{\text{组间}}=0.020$
	7 d	0.92 ± 0.30		
	14 d	0.92 ± 0.10		
	28 d	0.91 ± 0.30		
幼儿组	1 d	1.38 ± 0.30	$F_{\text{时间}}=1.970$	$P_{\text{时间}}=0.170$
	7 d	1.36 ± 0.10		
	14 d	1.37 ± 0.20		
	28 d	1.36 ± 0.20		

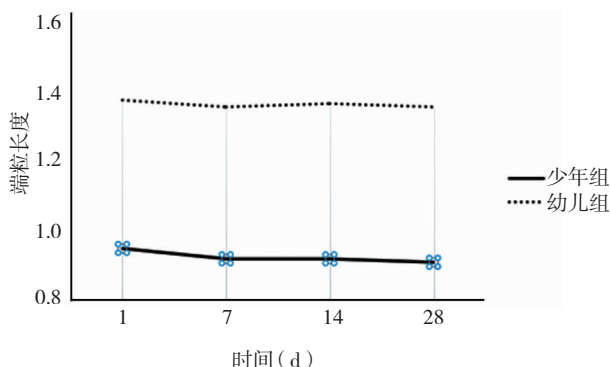
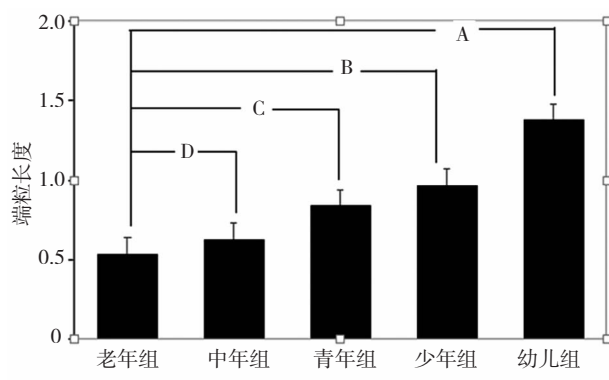


图 2 荧光 PCR 检测不同放置时间唾液斑 (幼年组与少年组) 平均端粒长度值

2.3 不同年龄段唾液斑细胞端粒长度比较

各年龄段新鲜唾液斑 (1 d) 端粒长度值: 幼儿组唾液斑平均端粒长度为 1.38 ± 0.06 , 少年组唾液斑平均端粒长度为 0.97 ± 0.03 , 青年组唾液斑平均端粒长度为 0.84 ± 0.02 , 中年组唾液斑平均端粒长度为 0.63 ± 0.02 , 老年组唾液斑平均端粒长度为 0.54 ± 0.03 (图 3)。方差分析结果显示: $F=7.138$, $P=0.018$; 其他 P 值如图 3 所示。提示不同年龄段间唾液斑平均端粒长度值差异有显著性, 且随年龄增加而缩短。



注: A 代表 $P(\text{老年} - \text{幼儿}) < 0.01$; B 表示 $P(\text{老年} - \text{少年}) < 0.01$; C 表示 $P(\text{老年} - \text{青年}) < 0.01$; D 表示 $P(\text{老年} - \text{中年}) < 0.01$ 。

图 3 荧光 PCR 检测各年龄组唾液斑平均端粒长度值

2.4 细胞端粒长度与年龄的相关性分析

供体年龄与新鲜唾液斑 (1 d) 平均端粒长度值呈负相关, 其相关系数 $r=-0.835$, $r^2=0.697$, $P<0.0001$ (图 4)。根据年龄与端粒长度的依存性得到推断年龄的回归方程: $Y=-75.006X+101.193$ [Y =年龄 (岁) X =TRF 值 (kb); 6.909 为 S_{y}]。

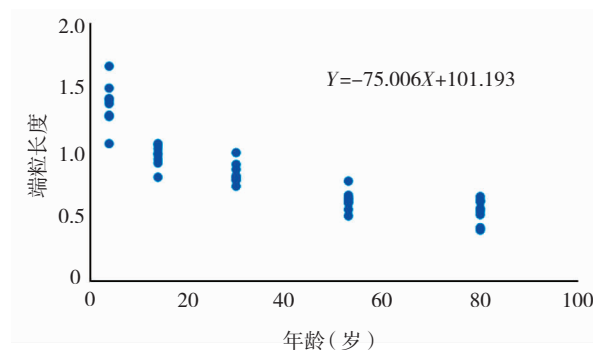


图 4 唾液斑平均端粒长度值的回归曲线

3 讨论

本实验主要以细胞端粒长度随年龄增加而变化为依据, 探讨人类唾液斑口腔上皮细胞端粒长度变化与年龄的关系, 检材新旧程度以及 2 种采集方式对结果有无影响, 为法医学通过微量易得检材推断年龄提供依据。研究发现唾液斑口腔上皮细胞端粒长度随年龄增加而缩短, 且各年龄组 2 种采集样本方式以及新旧检材之间无明显差异。

以往研究表明^[15]冰冻融化和 4°C 保存 4 d 的血液测得结果与直接静脉抽血后结果一致, 而近年来又有研究^[16]测出干燥血迹中的全血和单核细胞端粒

长度结果明显高于指尖取血或直接静脉抽血结果。本实验进一步考察了唾液斑陈旧程度以及不同提取检材对结果的影响。结果表明新旧程度、不同采集样本对端粒长度的影响不大,可能是样本保存比较完好、DNA 的稳定性强、端粒本身长度小^[17]等有关。目前,端粒长度变化的定性定量研究主要集中在肿瘤、遗传等临床医学疾病方面^[12],而在法医学应用中这种定量的研究甚少,特别是对于唾液斑口腔上皮细胞和头发毛囊细胞端粒长度的研究数据极少,根据前两个实验结果,进一步探讨了唾液斑端粒长度与年龄推断的关系,初步得出唾液斑中口腔上皮细胞端粒长度随年龄增加而缩短,并呈不均衡趋势,年龄越小丢失速率越快。端粒随年龄增长而缩短的机制大致包括不完全复制、染色体末端的降解和不均一重组,以及长时间的氧化应激等^[13-14]。此外端粒长度也会受社会因素、心理因素、行为因素、习惯因素、环境、疾病和其他因素的影响。本实验缺陷在于利用的样本量较少,可能出现误差,在下阶段的研究中将扩大样本量及细化年龄分段。

虽然个体年龄的推断依赖于很多因素,但当法医学检材如唾液斑、血液标本不具备形态学信息时,可以根据本方法在法医学实践中得到与年龄相关的一些有效信息。本研究根据唾液斑口腔上皮细胞 TRF 长度与年龄的依存性得出推断个体年龄的回归方程,无论是新鲜唾液斑还是陈旧性唾液斑,或是口腔拭纸,只要 DNA 保存完整,利用此方法可以提供个体大致的年龄范围。这无疑扩大了 DNA 技术的应用范围,尽可能地利用现场能够提取到的各种生物检材,为解决微量物证和陈旧性物证在个体年龄推断的难题提供了有价值的线索,为破案提高了可能性。然而,要使检测端粒长度推断年龄广泛应用于法医学实践,还需扩大样本量,细化年龄分段,这也是本研究下一步的努力方向。

参 考 文 献

[1] Gomez DE, Armando RG, Farina HG, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease(review)[J]. Medicina(B Aires), 2014,

74 (1):69-76.

[2] Zhai G, Aviv A, Hunter DJ, et al. Reduction of leucocyte telomere length in radiographic hand osteoarthritis a population-based study[J]. Ann Rheum Dis, 2006, 65(11):1444-1448.

[3] Damjanovic AK, Yang Y, Glaser R, et al. Accelerated telomere erosion is associated with a declining immune function of caregivers of Alzheimer's disease patients[J]. J Immunol, 2007, 179(6):4249-4254.

[4] Demissie S, Levy D, Benjamin EJ, et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study[J]. Aging Cell, 2006, 5(4):325-330.

[5] Khan S, Chuturgoon AA, Naidoo DP. Telomeres and atherosclerosis[J]. Cardiovasc J Afr, 2012, 23(10):563-571.

[6] Obana N, Takagi S, Kinouchi Y, et al. Telomere shortening of peripheral blood mononuclear cells in coronary disease patients with metabolic disorders[J]. Intern Med, 2003, 42(2):150-153.

[7] 葛璐璐, 刘超, 陈晓晖, 等. 人外周血白细胞端粒 DNA 长度变化与性别的关系[J]. 中国法医学杂志, 200406 期.

[8] 葛璐璐, 刘超, 陶黎阳, 等. 不同年龄组白细胞端粒 DNA 长度变化研究[J]. 法医学杂志, 200304 期.

[9] Okuda K, Bardeguet A, Gardner JP, et al. Telomere length in the newborn[J]. Pediatric Research, 2002, 52(3):377-381.

[10] 陈嘉昌, 张红宇, 彭瑾瑜, 等. 从唾液获取人体 DNA 的简易方法与应用[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2006S2 期.

[11] 张婷婷. 早发冠心病患者外周血白细胞端粒长度变化及其相关机制研究[J]. 北京:北京协和医学院(医学科学版), 2014 硕士版.

[12] von Figura G, Hartmann D, Song Z, et al. Role of telomere dysfunction in aging and its detection by biomarkers[J]. J Mol Med(Berl), 2009, 87(12):1165-1171.

[13] Hou L, Wang S, Dou C, et al. Air pollution exposure and telomere length in highly exposed subjects in Beijing, China a repeated-measure study[J]. Environ Int, 2012, 48:71-77.

[14] 黄河, 孙洁. 端粒结合蛋白研究进展[J]. 浙江大学学报(医学版), 200406 期.

[15] Dupont N, Jiang S, Pilli M, et al. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β [J]. EMBO J, 2011, 30(23):4701-47011.

[16] Jorgensen PB, Fedder J, Koelvraa S, et al. Age-dependence of relative telomere length profiles during spermatogenesis in man[J]. Maturitas, 2013, 75(4):380-385.

[17] Takubo K, Aida J, Izumiyama-Shimomura N, et al. Changes of telomere length with aging[J]. Geriatr Gerontol Int, 2010, 10(s1):197-206.

(责任编辑:方 济)