DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.05.006

*NOS*1 基因 rs3782206 多态性对反应抑制的影响：事件相关电位研究*

韩冰倩　赵　琬　张志芳　黄　玲　李　君△
（北京师范大学认知神经科学与学习国家重点实验室及 IDG/麦戈文脑科学研究院，北京 100875）

摘　要　目的　探讨神经型一氧化氮合成酶基因（*NOS*1）rs3782206 多态性与反应抑制能力的相关性。**方法**　以 132 名健康被试为研究对象，通过偏相关分析，验证 NoGo-N2 效应与反应抑制能力是否有显著相关性。根据 rs3782206 基因型将被试分为风险等位基因（T）携带者组和非携带者组。通过协方差分析比较不同基因型组完成点阵图预期任务（DPX 任务）时探测刺激阶段 N2 差异波（$N2_{AY-AX}$）波幅是否存在差异。**结果**　在控制了协变量年龄、性别和工作记忆能力（E_{BX-AY}）后，差异波 $N2_{AY-AX}$ 的波幅与 E_{AY} 显著相关（$r=0.21$；$P<0.05$）。风险等位基因携带者组的差异波 $N2_{AY-AX}$ 波幅显著大于非携带者组，差异具有统计学意义（$F=4.73$；$P<0.05$）。**结论**　验证了以 NoGo-N2 效应作为反应抑制能力电生理指标的正确性。并进一步发现 *NOS*1 rs3782206 主要通过影响反应抑制功能发挥精神分裂症易感作用。

关键词　点阵预期任务；事件相关电位；精神分裂症；*NOS*1 基因；反应抑制
中图分类号：R749　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-9760（2017）10-333-05

The contribution of *NOS*1 gene polymorphism (rs3782206) to response inhibition: an ERP study

HAN Bingqian, ZHAO Wan, ZHANG Zhifang, HUANG Ling, LI Jun△
(*State Key Laboratory of Cognitive Neuroscience and Learning & IDG/McGovern Institute for Brain Research, Beijing Normal University, Beijing* 100875, *China*)

Abstract: ***Objective***　To explore the association of the *NOS*1 gene polymorphism (rs3782206) with response inhibition***Methods***　132 healthy subjects were involved in this study and divided into two groups according to the genotype of rs3782206. Partial correlation was used to test the relationship between NoGo-N2 and response inhibition. ANCOVA was used to test the difference between genotypes on the amplitude of the difference wave of the probe-phased N2 ($N2_{AY-AX}$). ***Results***　After controlling for covariates, the amplitude of the differential wave $N2_{AY-AX}$ was correlated significantly with EAY ($r=0.21$; $P=0.020$). The TT/TC genotype group had higher amplitude of $N2_{AY}$ vs. $N2_{AX}$ than the CC genotype group ($F=4.73$; $P=0.032$). ***Conclusion***　These findings provide the evidence for the validity of using E_{AY} as a measure of response inhibition and suggest that the response inhibition may be a possible cognitive mechanism underlying the association between *NOS*1 gene polymorphism rs3782206 and schizophrenia.

Keywords: Dot pattern expectancy task; Event-related potential; Schizophrenia; *NOS*1 gene; Response inhibition

点阵图预期（DPX）任务在近年来被大力推荐用于精神分裂症工作记忆障碍的评定工具[1-2]，但是作为一种改良版的 AX-CPT 任务（Go/NoGo 范式之一），DPX 任务也可以用来评价反应抑制能力。在评价不同能力时，DPX 任务使用了不同的评价

* ［基金项目］973 项目（2014CB846102）；国家自然科学基金面上项目（81571045）
△ ［通信作者］李君，E-mail：lijundp@bnu.edu.cn

指标[3]。我们在既往的一项针对 DPX 任务的行为水平研究中发现精神分裂症风险基因 *NOS*1 多态性 rs3782206 与反应抑制能力相关而与工作记忆能力并不相关。大量事件相关电位(event related potential, ERP)研究证实,在 Go/NoGo 实验范式中,NoGo 刺激后大约 200 ~ 300ms 内前额叶产生的 N2 成分相对于 Go 刺激有更大的负向波幅,该现象被称为 NoGo-N2 效应[4]。通常认为该效应可以反映反应抑制能力中的冲突监控过程[5-6]。因此,我们希望通过本研究继续考察 *NOS*1 基因 rs3782206 是否作用于 DPX 任务中的 NoGo-N2 效应。

1　对象和方法

1.1　对象

研究对象为 2015 年 5 月至 2015 年 12 月间招募的 140 名健康志愿者。入组标准:通过专业的精神科医师进行非结构化访谈排除精神病史和精神病家族史;年龄 18 ~ 45 岁;右利手;汉族;经矫正后视力正常。由被试签署知情同意书,本研究已获得北京师范大学伦理委员会的批准。其中,8 名被试由于过高的错误率被剔除。在最终进入统计的 132 例被试中,男性 105 例,女性 27 例;平均年龄(26.7 ± 5.0)岁;平均受教育年限(12.3 ± 2.7)年;平均智商 111.1 ± 11.3。

1.2　方法

1.2.1　刺激材料和实验范式　实验采用 DPX 任务[1],任务流程及刺激条件见图 1。DPX 任务采用双刺激(线索刺激和探测刺激)任务范式,但与经典 AX-CPT 范式不同的是,DPX 任务的刺激材料是 12 种不同的盲文点阵图形,其中线索刺激分为靶线索刺激 A(由一种点阵图形构成)和非靶线索刺激 B(由 5 种点阵图形构成),探测刺激分为靶探测刺激 X(由一种点阵图形构成)和非靶探测刺激 Y(由 5 种点阵图形构成)。被试需要对靶线索刺激 A 后出现的靶探测刺激 X(即 AX 型刺激)做靶反应;而对其他情况(即 AY、BX、BY 型刺激)做非靶反应。

实验任务流程如下:首先呈现持续时间为 500ms 的注视点;接着呈现线索刺激,持续时间为 1000ms;随后,经过 2000ms 的空白间隔后,呈现探测刺激,持续时间为 500ms;最后呈现空白间隔,随机持续时间 1600 ~ 1650ms。探测刺激呈现后,被试就可以进行反应了。共包括 240 个试验,分为 2 个组块,每组块各包含 120 个试验。每个组块中 AX、AY、BX、BY 实验条件呈现次数分别为:84, 15, 15 和 6,相应占比分别为 70%, 12.5%, 12.5% 和 5%。

反应抑制能力通常使用 AY 错误率(E_{AY})来评定[7],而工作记忆能力则通常使用 BX 错误率与 AY 错误率间的差异(E_{BX-AY})来评定[3]。

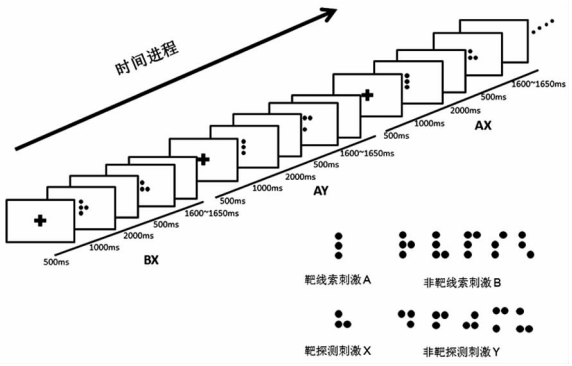


图 1　DPX 任务流程图

1.2.2　ERP 数据采集和处理　在被试进行任务的同时采集脑电图(EEG)数据,并同步记录行为学数据。采用 BrainProduct(Gilching, German)的 ERP 系统和放大器及国际 10-20 标准系统 64 导的脑电帽记录 EEG。采样滤波带通为 0.01 ~ 100Hz,采样频率为 500Hz,头皮与电极间阻抗 < 5kΩ。参考电极置于右乳突,接地电极置于前额正中,垂直眼动(VEOG)置于右眼眶的上方和下方,水平眼动(HEOG)置于左右外眦外侧。在采集过程中,受试者坐在安静封闭、电屏蔽的记录室内,面对显示器,完成任务。

使用 BrainVision Analysis 软件对记录的 EEG 数据进行离线分析。EEG 以全脑平均电极作为重新参照。预处理包括 2Hz ~ 12Hz 范围的滤波(为防止 N2 成分被 P3 成分吸收)[8]。截取 EEG 片段分析视窗:探测刺激呈现前 200ms(基线),至呈现后 2000ms。以线索刺激前 200ms 脑电波幅的平均值作为基线。充分排除眼电(VEOG、HEOG)及其他伪迹(肌肉紧张、飘移等,波幅大于 ± 80μV 者)等干扰。

对反应正确的 EEG 进行分类叠加，得到 AX 和 AY 两种实验条件分别的 ERP 数据。本研究只关注探测刺激阶段的 N2 成分，时间窗选取探测刺激呈现后 250 ~ 320ms，根据脑电地形图，我们选择 FCz 电极进行分析。我们首先分别计算 AY 条件（$N2_{AY}$）与 AX 条件（$N2_{AX}$）分别的 N2 波，然后计算他们之间的差异波（$N2_{AY-AX}$，用 $N2_{AY}$ 减去 $N2_{AX}$）。由于 N2 是负波，因此 $N2_{AY}$ 和 $N2_{AX}$ 波幅数值越大（越正）代表其相应 N2 波越小。由于 AY 条件诱发的 N2 波比 AX 条件诱发的 N2 波更大（更负），因此 $N2_{AY-AX}$ 波幅数值越大代表两个条件下的 N2 波差异越小。

1.2.3　基因分型　以标准方法提取出全基因组 DNA。使用 Taqman allele-specific 探针以及 7900HT Fast 实时 PCR 系统（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）进行 rs3782206（C/T）的基因分型实验。分型成功率为 100%，对 50% 样本进行重复测试确定分型正确率为 100%。最终纳入分析的被试中，TT 基因型 10 名；TC 基因型 51 名；CC 基因型 71 名。由于 TT 基因型被试人数偏少，我们将 TT 基因型和 TC 基因型合并为风险等位基因携带者组（N = 61），而将纯合子 CC 基因型作为风险等位基因非携带者组（N = 71）。

1.3　统计学方法

使用 PLINK 软件对基因型进行 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验。其余所有统计均采用 SPSS20.0 进行。在对基因型组间一般人口学因素的比较中，采用独立样本 t 检验或 χ^2 检验对其分析。

采用偏相关分析来验证以 NoGo-N2 效应作为反应抑制能力电生理指标的正确性。控制年龄、性别和 EBX-AY 因素后，检测行为水平测量指标 EAY 与探测阶段差异波 N2AY-AX 波幅的相关性。

采用协方差分析检测 N2 成分与 rs3782206 基因型之间的相关性。在这个分析中，基因型（TT/TC, CC）为自变量，年龄和性别为协变量，$N2_{AY-AX}$ 为因变量。

2　结果

2.1　人口学因素比较

样本内总体被试基因型符合 Hardy-Weinberg 平衡检验（$P > 0.05$）。基因型组间的年龄、性别、受教育程度和智商等各人口学因素的分布均无显著性差异（$P > 0.05$）（见表 1）。

表 1　rs3782206 基因型组间人口学因素的比较

组别	n	性别（男/女）	年龄（岁）	受教育程度（年）	IQ[a]
风险等位基因携带者组	61	51/10	26.7 ± 5.0	12.1 ± 2.9	110.0 ± 11.8
风险等位基因非携带者组	71	54/17	26.6 ± 5.0	12.5 ± 2.5	112.1 ± 10.7
t/χ^2		1.15	0.02	0.78	1.21
P		0.28	0.88	0.38	0.27

注：a 由韦氏智商量表测得

2.2　$N2_{AY-AX}$ 与 E_{AY} 的相关性

偏相关分析结果显示，在控制了协变量年龄、性别和工作记忆能力（E_{BX-AY}）后，差异波 $N2_{AY-AX}$ 的波幅与 E_{AY} 偏相关系数 $r = 0.21$（$P < 0.05$）（图 2），即 AY 条件和 AX 条件间 N2 波幅差异越大（$N2_{AY-AX}$ 越小），反应抑制能力越好（E_{AY} 越小）。

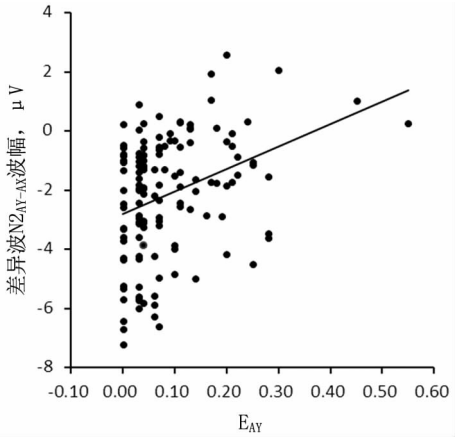


图 2　E_{AY} 与差异波 $N2_{AY-AX}$ 波幅的相关性

2.3　两组间 N2 成分的比较

两组间探测刺激阶段的差异波 $N2_{AY-AX}$ 波幅存在显著差异（$F = 4.73$；$P < 0.05$）。协方差事后检验表明，携带风险等位基因者组的差异波 $N2_{AY-AX}$ 的波幅显著大于不携带风险等位基因者组，即携带风险等位基因者组在 AY 和 AX 两种不同实验条件下的 N2 成分差异更小。见图 3。

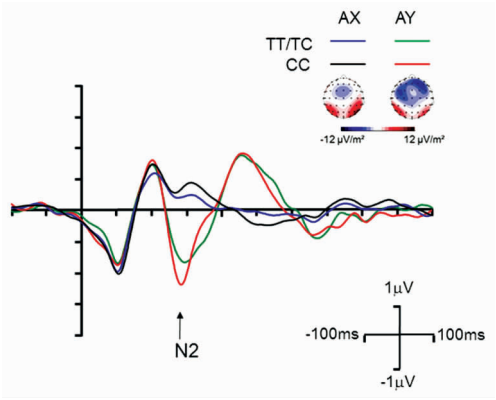


图 3　不同基因 N2 波形图

3　讨论

本研究基于课题组之前的研究发现，即精神分裂症风险基因多态性 rs3782206 与 DPX 任务 E_{AY} 显著相关，进一步分析了该相关性的脑机制。结果发现 rs3782206 与 NoGo-N2 效应显著相关。提示 rs3782206 风险等位基因通过反应抑制能力缺陷而增加精神分裂症发病风险。

在 DPX 任务中，由于 AX 实验条件占比高达 70%，而 AY 实验条件只占比 12.5%，即大多数靶线索刺激后面出现的都是靶探测刺激，因此若被试识别出靶线索刺激 A 并将之成功保留在工作记忆中，则会产生强烈的要进行靶反应的预期和冲动。如此一来，当靶线索刺激刺激后的探测刺激不是 X 而是 Y 时，被试需要抑制住这种预期和冲动，否则就容易产生错误的按键反应，造成 E_{AY} 显著升高[9]。这也是既往研究经常使用 E_{AY} 作为反应抑制功能行为学评定指标的原因。

NoGo-N2 效应主要出现在 Go/NoGo 实验范式中，是 NoGo 实验条件相对于 Go 实验条件产生更大的 N2 波。既往研究提示 NoGo-N2 效应对反应抑制功能的评定具有高度灵敏度和客观性[5-6]。DPX 任务的 AX 和 AY 实验条件恰好满足 Go/No-Go 实验范式的要求。AX 实验条件对应 Go 实验条件，而 AY 实验条件对应 NoGo 实验条件。本研究中，由图 2 所示波形图可以看到明显的 NoGo-N2 效应。无论在何种基因型中，AY 实验条件都可以诱发出比 AX 实验条件更大的 N2。接下来，我们使用差异波 $N2_{AY-AX}$ 刻画 NoGo-N2 效应，并发现 $N2_{AY-AX}$ 波幅与 E_{AY} 显著相关，提示 AY 和 AX 两个实验条件间 N2 的波幅差异越大，则反应抑制能力越强。这一发现与既往其他课题组研究结果是一致的，例如 Falkenstein 等[10] 发现在 Go/NoGo 任务中 NoGo 错误率越低，NoGo-N2 效应越明显。因此，N2 成分可以表征反应抑制功能。综上，我们使用探测刺激后面的 N2 作为脑电生理指标来研究 rs3782206 与反应抑制能力之间的关系是可行的。

本研究使用协方差分析发现 rs3782206 实验条件的交互作用显著，即风险等位基因携带者 AY 与 AX 条件下 N2 的差异变小。这为我们在行为水平研究中发现的风险等位基因携带者 E_{AY} 升高提供了电生理证据，即 rs3782206 与反应抑制能力相关。具体来说，正是因为风险等位基因损害了反应抑制能力，使得风险等位基因携带者在 AY 实验条件下不能抑制住进行靶反应的冲动而做出了错误的反应。

基于本研究结果，我们可以解释课题组在既往发表的研究中的其他结果[11]。在既往的这项研究中，我们发现风险等位基因携带者 N-BACK 任务的错误率升高[12]，stroop 任务及 ANT 任务的冲突效应增大[13-14]。在对 DPX 任务的分析中，虽然发现风险等位基因导致 E_{AY} 升高，但 E_{BX-AY} 并无显著升高或降低。通过本研究结果，我们可以了解 rs3782206 可能通过作用于反应抑制能力而产生与上述行为水平评定指标的相关性。事实上，上述任务中均包含反应抑制能力的评价。在 N-BACK 任务中，被试需要克服当前刺激的影响，而对当前刺激之前的刺激进行反应。在 stroop 任务中，被试需要克服语言刺激对颜色刺激的干扰。在 ANT 这一 flanker 任务中，被试需要克服两侧干扰刺激的影响而对中间的靶刺激进行反应。

综上所述，本研究应用 ERP 技术，通过对 N2 成分的分析，发现 *NOS1* 基因 rs3782206 风险等位基因携带者 NoGo-N2 效应减弱。这为该风险基因与精神分裂症的相关性提供了脑机制方面的证据，从而帮助我们更好地理解风险基因多态性的易感机制。

参考文献：

[1] Barch DM, Berman MG, Engle R, et al. CNTRICS final task selection: working memory [J]. Schizophr Bull,

2009,35(1):136-152. DOI:10.1093/schbul/sbn153.
[2] Carter CS, Minzenberg M, West R, et al. CNTRICS imaging biomarker selections: Executive control paradigms [J]. Schizophr Bull, 2012, 38(1): 34-42. DOI: 10.1093/schbul/sbr114.
[3] Henderson D, Poppe AB, Barch DM, et al. Optimization of a goal maintenance task for use in clinical applications[J]. Schizophr Bull, 2012, 38(1): 104-113. DOI: 10.1093/schbul/sbr172.
[4] 岳玲,唐莺莹,亢清,等.神经性厌食患者反应抑制功能事件相关电位的研究[J].临床精神医学杂志,2016,26(3):151-154.
[5] Bekker EM, Kenemans JL, Verbaten MN. Electrophysiological correlates of attention, inhibition, sensitivity and bias in a continuous performance task[J]. Clin Neurophysiol, 2004, 115(9): 2001-2013. DOI: 10.1016/j.clinph.2004.04.008.
[6] Smith JL, Johnstone SJ, Barry RJ. Effects of pre-stimulus processing on subsequent events in a warned Go/NoGo paradigm: response preparation, execution and inhibition [J]. Int J Psychophysiol, 2006, 61(2): 121-133. DOI: 10.1016/j.ijpsycho.2005.07.013.
[7] Hogan M, Kiefer M, Kubesch S, et al. The interactive effects of physical fitness and acute aerobic exercise on electrophysiological coherence and cognitive performance in adolescents[J]. Exp Brain Res, 2013, 229(1): 85-96. DOI: 10.1007/s00221-013-3595-0.
[8] Donkers FC, van Boxtel GJ. The N2 in go/no-go tasks reflects conflict monitoring not response inhibition[J]. Brain Cogn, 2004, 56(2): 165-176. DOI: 10.1016/j.bandc.2004.04.005.
[9] 陈安涛,宋爽.酒精对认知控制方式的影响[J].辽宁师范大学学报(社会科学版),2016,39(2):45-52. DOI:10.16216/j.cnki.1sxbwk.201602045.
[10] Falkenstein M, Hoormann J, Hohnsbein J. ERP components in Go/Nogo tasks and their relation to inhibition [J]. Acta Psychol (Amst), 1999, 101(2-3): 267-291. DOI:10.1016/s0001-6918(99)00008-6.
[11] Zhang Z, Chen X, Yu P, et al. Evidence for the contribution of *NOS*1 gene polymorphism (rs3782206) to prefrontal function in schizophrenia patients and healthy controls[J]. Neuropsychopharmacology, 2015, 40(6): 1383-1394. DOI:10.1038/npp.2014.323.
[12] Kopf J, Schecklmann M, Hahn T, et al. *NOS*1 ex1f-VNTR polymorphism influences prefrontal brain oxygenation during a working memory task[J]. Neuroimage, 2011, 57(4): 1617-1623. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2011.05.034.
[13] Fan J, Flombaum JI, McCandliss BD, et al. Cognitive and brain consequences of conflict[J]. Neuroimage, 2003, 18(1): 42-57. DOI:10.1006/nimg.2002.1319.
[14] Kopf J, Schecklmann M, Hahn T, et al. *NOS*1 ex1f-VNTR polymorphism affects prefrontal oxygenation during response inhibition tasks[J]. Hum Brain Mapp, 2012, 33(11): 2561-2571. DOI:10.1002/hbm.21382.

(收稿日期 2017-07-11)
(本文编辑:甘慧敏)

(上接第332页)

[11] Bigler ED, Mortensen S, Neeley ES, et al. Superior temporal gyrus, language function, and autism[J]. Dev Neuropsychol, 2007, 31(2): 217-238. DOI: 10.1080/87565640701190841.

(收稿日期 2017-06-25)
(本文编辑:甘慧敏)

·简讯·

《济宁医学院学报》期刊影响力指数再一次提升

十二五期间,《济宁医学院学报》的影响因子连续5年不断攀升。2016年——十三五规划的开局之年,中国学术期刊影响因子年报统计数据显示:《济宁医学院学报》期刊影响力指数(CI值)达158.75,超过了2015年的145.92,该指标在山东省同类医学院校中名列前茅。

本刊编辑部