论著

文章编号:1000-5404(2013)22-2460-04

儿童青少年脑容积比内表型的双生子研究

马兴顺[1],傅一笑[1],胡小梅[1],蒙华庆[1],李 涛[2],邓 伟[2],侯 枭[3],张晓薇[2],林 鄞[2],雷 威[2],李名立[2],康林娥[4],黄永峰[4],王 娜[4],邱 田[1],李 晓[1],刘 洋[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心[1];610041 成都,四川大学华西医院心理卫生中心[2];400030 重庆,重庆医药高等专科学校临床医学院[3];719000 陕西 榆林,陕西省榆林市第一医院神经内二科[4])

[摘要] **目的** 探索儿童青少年脑灰白质容积比、灰质全脑容积比、白质全脑容积比是否为稳定内表型,作为儿童脑发育的关键内表型指标。**方法** 采用横断面设计双生子法,以学籍登记为线索募集12~18岁的双生子,采集静脉血液标本提取DNA,进行卵型鉴定。采用中国修订版-韦氏儿童智力量表进行智商测定。用3.0T MRI(GE)对双生子对进行头颅结构扫描,采集全脑166层矢状位图像。**结果** ①最终符合条件58对双生子成功提取DNA,卵型鉴定结果显示:同卵双生子31对,异卵双生子27对;②灰质容积、白质容积、脑脊液容积、全脑容积、灰白质容积比、灰质全脑容积比、白质全脑容积比在MZ间均呈正相关($P<0.01$);DZ除灰质全脑容积比及脑脊液容积呈正相关($P<0.05$)外,其余5项差异无统计学意义($P>0.05$);Holzinger方法估计灰白质容积比遗传度0.828,灰质全脑容积比遗传度为0.596,白质全脑容积比遗传度为0.741。**结论** 为克服个体脑容积差异而候选的3个容积比中,无脑脊液容积影响的灰白质容积比有较高遗传度,说明灰白质容积比有相对稳定的遗传基础,可以作为儿童青少年脑发育的内表型指标。

[关键词] 双生子;儿童青少年;内表型;灰质容积;白质容积;容积比

[中图法分类号] R322.81;R339.31 [文献标志码] A

Endophenotype of brain volume ratio in children and adolescents: a twin study

Ma Xingshun[1], Fu Yixiao[1], Hu Xiaomei[1], Meng Huaqing[1], Li Tao[2], Deng Wei[2], Hou Xiao[3], Zhang Xiaowei[2], Lin Yin[2], Lei Wei[2], Li Mingli[2], Kang Lin'e[4], Huang Yongfeng[4], Wang Na[4], Qiu Tian[1], Li Xiao[1], Liu Yang[1] ([1]Mental Health Center, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Mental Health Center, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041; [3]Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing, 400030; [4]Second Department of Neurology, First Hospital of Yulin, Yulin, Shaanxi Province, 719000, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore whether brain volume ratios such as gray-to-white matter volume ratio, gray matter-to-global volume ratio, and white matter-to-global volume ratio are stable endophenotypes which can be used as key endophenotype indexes of children and adolescents' brain development. **Methods** Using cross-sectional design, totally 58 pairs of twins aged 12 to 18 years were recruited according to the school registration information. DNA was extracted from venous blood samples to identify zygosity. Intelligence quotients (IQ) of participants were measured with C-Wechsler intelligence scale for children (C-WISC). With 3.0T MRI (GE), we examined all 58 twin pairs to obtain brain structure MR image for each person. **Results** (1) The 58 twin pairs included 31 monozygotic twin pairs (MZ group) and 27 dizygotic twin pairs (DZ group). (2) Gray matter volume, white matter volume, cerebrospinal fluid volume, global cerebral volume, gray-to-white matter volume ratio, gray matter-to-global volume ratio and white matter-to-global volume ratio were positively associated ($P<0.01$) in the MZ group. Cerebrospinal fluid volume and gray matter-to-global volume ratio showed positive correlation ($P<0.05$) in the DZ group while other 5 indexes showed non-significant difference ($P>0.05$). Heritabilities estimated by Holzinger's method of gray-to-white matter volume ratio, gray matter-to-global volume ratio, and white matter-to-global volume ratio were 0.828, 0.596, and 0.741, respectively. **Conclusion** The heritability of gray-to-white matter volume ratio is highest in all volume

[基金项目] 国家自然科学基金(81101025)

[通信作者] 傅一笑,E-mail:fyx7766@gmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130912.1524.001.html(2013-09-12)

ratios and is not affected by cerebrospinal fluid volume. Thus, gray-to-white matter volume ratio may be used as a stable endophenotype indicator for brain development research of children and adolescents.

[**Key words**] twin; children and adolescents; endophenotype; gray matter volume; white matter volume; volume ratio

Supported by the National Nature Science Foundation of China (81101025). Corresponding author: Fu Yixiao, E-mail: fyx7766@gmail.com

认知、情感、行为特征以及精神病都是高度遗传的表型,但是很难识别出与之相关的特定基因片段及机制,一种已经尝试的方法可以使这个问题变得容易处理,即识别和量化基因到行为中介桥梁的生物学标记,通过神经影像学发现若干脑解剖和生理标记作为稳定的中介桥梁[1],这个中介桥梁——中介表型即是我们渴望得到的内表型。20世纪70年代,Gottcsman等[2]提出内表型(endophenotype)的概念,即内表型不是很明显的、外在的,而是微观的、内在的,介于基因型和表现型之间,更接近于疾病生物学基础的特殊表型。对于遗传学研究来说。通过生物学内表型,可以从各种精神心理疾病综合征——高度异质性的疾病中,筛选出具有或不具有某种表型的群体,从而提研究样本的同质性,找出决定该表型的关键基因,故之前研究设计是从表型到内表型再到基因为基本路线[3-5],但这样的研究设计缺乏有效内表型评估方法。

双生子法[6]是研究遗传和环境对表型影响的常用方法,能估计出这些指标遗传度,遗传度越大,表型越接近于基因,越符合内表型指标概念,故双生子法以其特有的优势可以作为内表型指标评估的主要方法[7],即可有新的研究设计路线:双生子法到内表型再到基因或表型/疾病。

通过脑影像学分析大脑结构是精神疾病内表型探索的重点,已用分析大脑形态结构与疾病相关性的指标包括脑容积、白质容积、灰质容积、皮层厚度、密度等[8-9]。人脑发育过程中不同脑区结构及神经通白质容积改变是随年龄增长持续增加的[10],而灰质路有明显的动态的变化轨迹,一项关于儿童青少年脑发育的磁共振纵向研究证实:在儿童青少年这个阶段容积改变随年龄增长呈倒U型轨迹变化,其峰值出现时间因脑区不同而不同[11]。以往的研究表明脑结构是高度遗传的[12],同样大脑发育这种动态变化轨迹也是受遗传控制的[1],也发现在儿童自闭症、多动症、儿童起病精神分裂症这种脑发育轨迹存在异常[1],然而在横断面研究设计中使用灰质容积、白质容积指标混杂了个体脑容积差异[13],其降低了研究可信度。故用容积比的办法来克服个体脑容积差异是一种可能的选择办法。本研究候选灰质白质容积比、灰质全脑容积比、白质全脑容积比[14]作为可能的指标,通过双生子法估计3种容积比遗传度,探索前述3种容积比是否成为有用的内表型指标,是否可在儿童青少年脑结构和功能发育研究中发挥作用。

1 对象与方法

1.1 对象

经教委途径获得双生子学籍资料,采用横断面设计,以学籍登记为线索募集重庆市12~18岁儿童青少年双生子68对。双生子纳入标准:12~18岁的全民教育在校学生;排除标准:排除躯体疾病、精神疾病无法参加测试者、韦氏智力测评信息IQ<90。在法定监护人家长及受试者签署书面知情同意书后,参与调查和采集血液标本。本研究得到重庆医科大学伦理委员会批准。共收回58对符合条件(116个体)的脑结构MRI信息。见表1。

表1 双生子不同性别、年龄分布情况

双生子类别	例数	性别		年龄(岁)						
		男性	女性	12	13	14	15	16	17	18
MZ	62	26	36	2	4	10	2	24	14	6
DZ	54	25	29	2	4	8	8	16	10	6
合计	116	51	65	4	8	18	10	40	24	12

MZ:同卵双生子;DZ异卵双生子

1.2 方法

1.2.1 采脑影像图像设备及参数 高分辨T_1加权图像的获得采用GE3.0T磁共振成像系统(EXCITE,General Electric,Milwaukee,USA),并用最新的8通道头线圈以提高信噪比。所有纳入者的3D T1图像通过3D梯度回波序列(gradient echo)获得,扫描参数如下:TR=6.2 ms。TE=2.8 ms,翻转角为25°,层厚为1.2 mm,单次激发(one NEX),FOV为24 cm×24 cm,矩阵为256×256,体素大小为0.47 mm×0.47 mm×1 mm,全脑共采集166层矢状位图像。

1.2.2 脑结构分析方法及过程 用基于体素的形态学分析方法(voxel-basedmorphometry,VBM)[15]及TOM8创建用于12~18岁大脑空间配准的模板,TOM工具箱是一种全新处理儿童脑影像提供参考数据的方法,其原始脑影像数据源于美国国立卫生研究所正常脑发育磁共振研究项目,这样可以减少SPM软件自带模板所带来的误差[16]。MRI图像处理过程:(1)用MicroN软件将所有图像由DICOM格式转化为img格式,并用SPM8逐个以AC-PC线为基线统一空间对位。(2)用TOM制作12~18岁儿童脑模板。(3)采用VBM8软件进行图像的处理:①用儿童模板对所有MRI图像进行空间配准;②对标准化的图像进行分割(灰质、白质、脑脊液)。(4)对标准化分割后的结果进行平滑,平滑方法是:高斯半峰全宽(full width at half-maximum,FWHM),平滑核大小是6 mm×6 mm×6 mm。

表2 MZ组和DZ组容积指标在双生子间相关分析及遗传度估计值

组别	MZ（31对）				DZ（27对）				Z值	h^2
	r_{MZ}	t值	P值（双侧）$\nu=29$	z_1值	r_{DZ}	t值	P值（双侧）$\nu=25$	z_2值		
灰质容积	0.894	10.745	<0.001	1.442	0.322	1.701	>0.05	0.334	3.983	0.844
白质容积	0.919	12.553	<0.001	1.648	0.146	0.738	>0.05	0.147	5.396	0.905
脑脊液容积	0.720	5.587	<0.001	0.908	0.407	2.228	<0.05	0.432	1.711	0.528
全脑容积	0.943	15.260	<0.001	1.764	0.076	0.381	>0.05	0.076	6.068	0.938
灰白质容积比	0.866	9.326	<0.001	1.317	0.222	1.138	>0.05	0.226	3.922	0.828
灰质全脑容积比	0.768	6.458	<0.001	1.015	0.426	2.354	<0.05	0.455	2.013	0.596
白质全脑容积比	0.838	8.270	<0.001	1.214	0.374	2.016	>0.05	0.393	2.951	0.741

r_{MZ}：MZ间表型相关系数；r_{DZ}：DZ间表型相关系数；ν：自由度；h^2：遗传度；t：相关系数t检验值；z_1：MZ间相关系数r-z转化值；z_2：DZ间相关系数r-z转化值；Z：统计量

1.2.3 智力调查工具 中国修订版-韦氏儿童智力量表（C-Wechsler intelligence scale for children，C-WISC）由龚耀先等于1993年修订。

1.2.4 双生子的卵型鉴定 所有双生子接受DNA卵型鉴定。方法为：（1）DNA提取：征求受试者法定监护人父母及其同意后，用含K2EDTA抗凝管采静脉血4 mL速冻后，送川大华西医院科技园精神卫生实验室提取DNA。（2）卵型鉴定：仪器Genetic Analyzer 3100Avant™，采用ABI公司AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit检测15个短串联重复序列（STR）位点及牙釉蛋白基因（Amelogenin）进行卵型鉴定，即鉴定双生子对为同卵双生子（monozygotic twins，MZ）还是异卵双生子（dizygotic twins，DZ）。MZ为15个STR位点及Amelogenin都相同的双生子对；而DZ包括不同性别的双生子对和至少1个遗传标记位点不同的同性别的双生子对。通过这种遗传分析，MZ的可靠性可以达到0.999[17]。

1.3 统计学方法

采用线性相关分析，用EXCEL 2007和SPSS 20.0统计软件转入原始分割灰白质及脑脊液容积并计算个体全脑容积（为灰质、白质、脑脊液之和）、灰白质容积比（灰质容积/白质容积）、灰质全脑容积比（灰质容积/全脑容积），白质全脑容积比（白质容积/全脑容积）；用R软件OpenMx 2.15.2软件包计算双生子间表型相关系数，并进行相关系数t检验；进行r-z转换目的检验MZ和DZ间相关系数是否相同，其中，z_1、z_2分别为相关系数的z函数值，n_1、n_2为两样本量。取$\alpha=0.05$，如果统计量$Z>1.96$，则可以拒绝两样本相关系数相同的假设，认为两样本相关系数的大小具有统计学意义[18]。以下为r-z转化公式以及Z统计量计算公式：

$$z=1/2ln\frac{1+r}{1-r}$$

$$Z=(z_1-z_2)/sqrt(\frac{1}{n_3-3}+\frac{1}{n_3-3})$$

采用Holzinger方法[19]估计遗传度公式：$h^2=(r_{MZ}-r_{DZ})/(1-r_{DZ})$，其中$r_{MZ}$为MZ间表型相关系数，$r_{DZ}$为DZ间表型相关系数。

2 结果

见表2。灰质容积、白质容积、脑脊液容积、全脑容积、灰白质容积比、灰质全脑容积比、白质全脑容积比在MZ间均呈正相关（$P<0.01$）；DZ除灰质全脑容积比及脑脊液容积呈正相关（$P<0.05$）外，其余5项差异无统计学意义（$P>0.05$）。MZ和DZ脑脊液容积相关系数大小无统计学差异（$P>0.05$），MZ和DZ在其余6项中的相关系数大小差异有统计学意义（$P<0.05$）。相关系数比较说明，在除脑脊液容积及灰质全脑容积比外其余5项指标在MZ的相似程度明显大于DZ；无脑脊液容积影响指标的4项指标遗传度估计均>0.800，说明灰质、白质容积及灰白质容积比在个体变异中至少有80%是受遗传因素控制的。

3 讨论

儿童青少年阶段是大脑发育的关键阶段，本研究在12~18岁儿童青少年阶段，灰质容积、白质容积、全脑容积均显示了较高遗传度，提示在遗传环境因素中，遗传对脑灰质容积、白质容积、全脑容积起决定性作用，这与先期研究结果相符，即脑结构是高度遗传的[12]；根据以上统计结果，MZ与DZ双生子间脑脊液容积相关系数大小无统计学差异，估计脑脊液容积遗传度0.55，提示遗传对脑脊液容积影响与灰质容积、白质容积、全脑容积相比作用较低，遗传度提示环境因素对脑脊液影响也很重要。脑脊液在颅内分布于脑室及蛛网膜下腔内，有其特有的循环通路，缓冲脑和脊髓压力，对脑和脊髓有保护和支持作用，正常人脑压受一些因素影响而在一定正常范围内（80~180 mmH_2O）波动[20]，可能受试者检测时情绪、血压、颈部弯曲程度等因素对脑压有一定影响，这种脑压变化对检测时影像学脑脊液容积大小有一定影响，这也就是数据统计提示环境对脑脊液容积有很重要影响的原因。

儿童青少年这个阶段白质容积改变随年龄增长持续增加[10]，而灰质容积改变随年龄增长呈倒U型轨迹变化，其峰值出现时间因脑区不同而不同[11]。大脑发育这种动态变化轨迹也是受遗传控制的[1]，然而在横断面研究设计中使用灰质容积、白质容积指标混杂了个体脑容积差异[13]，其降低了研究可信度。本研究用容积比校正个体脑容积差异，候选3种容积比，即灰白质容积比、灰质全脑容积比、白质全脑容积比，相比之下灰质全脑容积比和白质全脑容积比遗传度明显低于灰白质容积比，这与上述脑脊液本身特性有关；全脑容积为灰质容积、白质容积、脑脊液容积三者之和，故受脑脊液容积影响，灰质全脑容积比遗传度0.596、白质全脑容积比遗传度0.741，遗传度并不高，而无脑脊液容积影响的灰白质容积比呈现出较高遗传度，接近于灰质容积遗传度，因而灰白质容积比有稳定遗传基础，也反应出大脑灰质白质在基因控制下是协调发育的，故可以认定灰白质容积比为稳定内表型指标，其量化了大脑灰白质协调发育变化过程。因此，灰白质容积比可作为可靠内表型指标进一步用于横断面研究，可制定青少年儿童各年龄段灰白质比正常参考值范围，用于反应儿童青少年期脑发育状况评估，也可进一步研究儿童青少年脑部遗传疾病的灰白质比例变化，用于疾病早期诊断治疗干预依据。同理，可以尝试各脑区及子区容积比研究，当然能不能达到预期，尚需实践进一步证实。另外，本次研究难免有不足之处，因考虑到数据采集配合程度，对象只面向12～18岁正常儿童青少年双生子，没有覆盖整个儿童阶段对象；样本收集困难，致使目前样本量较小，分组时并没有考虑性别差异，只分为MZ与DZ组。

志谢 感谢参与本次调查的所有双胞胎；感谢川大华西医院精神卫生中心李涛团队

参考文献：

[1] Giedd J N, Lenroot R K, Shaw P, *et al*. Lenroot, Philip Shaw, *et al*. Trajectories of anatomic brain development as a phenotype[J]. Novartis Found Symp, 2008, 289: 101－118. 193－195.

[2] Gottesman I I, Gould T D. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions[J]. Am J Psychiatry, 2003, 160(4): 636－645.

[3] Gatt J M, Clark C R, Kemp A H, *et al*. A genotype-endophenotype-phenotype path model of depressed mood: integrating cognitive and emotional markers[J]. J Integr Neurosci, 2007, 6(1): 75－104.

[4] Rommelse N Nj, Altink M E, Martin N C, *et al*. Relationship between endophenotype and phenotype in ADHD[J]. Behav Brain Funct, 2008, 4: 4.

[5] Goodman M, New A S, Triebwasser J, *et al*. Phenotype, endophenotype, and genotype comparisons between borderline personality disorder and major depressive disorder[J]. J Pers Disord, 2010, 24(1): 38－59.

[6] Snieder H, Wang X, MacGregor A J. Twin Methodology[J]. San Francisco: John Wiley & Sons, 2010.

[7] Van-Haren N E, Rijsdijk F, Schnack H G, *et al*. The genetic and environmental determinants of the association between brain abnormalities and schizophrenia: the schizophrenia twins and relatives consortium[J]. Biol Psychiatry, 2012, 71(10): 915－921.

[8] Ashburner J, Friston K J. Voxel-based morphometry--the methods[J]. Neuroimage, 2000, 11(6 Pt 1): 805－821.

[9] Jenkinson M, Beckmann C F, Behrens T E, *et al*. FSL[J]. Neuroimage, 2012, 62(2): 782－790.

[10] Lenroot R K, Gogtay N, Greenstein D K, *et al*. Sexual dimorphism of brain developmental trajectories during childhood and adolescence[J]. Neuroimage, 2007, 36(4): 1065－1073.

[11] Giedd J N, Rapoport J L. Structural MRI of pediatric brain development: what have we learned and where are we going?[J]. Neuron, 2010, 67(5): 728－734.

[12] Wallace G L, Eric-Schmitt J, Lenroot R, *et al*. A pediatric twin study of brain morphometry[J]. J Child Psychol Psychiatry, 2006, 47(10): 987－993.

[13] Taki Y, Kawashima R. Brain development in childhood[J]. Open Neuroimaging J, 2012, 6: 103－110.

[14] Hasan K M, Walimuni I S, Frye R E. Global cerebral and regional multimodal neuroimaging markers of the neurobiology of autism: development and cognition[J]. J Child Neurol, 2012, 28(7): 874－885.

[15] 郭小娟，姚力，金真. 基于像素的形态测量学方法及其在脑图像处理中的应用[J]. 北京师范大学学报：自然科学版，2006，42(2)：213－216.

[16] Wilke M, Holland SK, Altaye M, *et al*. Template-O-Matic: a toolbox for creating customized pediatric templates[J]. Neuroimage, 2008, 41(3): 903－913.

[17] Yang M J, Tzeng C H, Tseng J Y, *et al*. Determination of twin zygosity using a commercially available STR analysis of 15 unlinked loci and the gender-determining marker amelogenin--a preliminary report[J]. Hum Reprod, 2006, 21(8): 2175－2179.

[18] 赵雯婧，傅一笑，覃青，等. 不同版本DAWBA探讨影响双生子心理健康发育因素的效度研究[J]. 第三军医大学学报，2011，33(2)：182－185.

[19] Todd J A, Farrall M. Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1diabetes[J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(Spec No): 1443－1448.

[20] 王维治. 神经病学[M]. 5版. 北京：人民卫生出版社，2002：118－121.

（**收稿**：2013-05-22；**修回**：2013-06-18）

（编辑 王小寒）