

· 学术交流 ·

儿童青少年注意缺陷多动障碍外周血全基因组

DNA 甲基化研究

罗杰 郑毅

100088 首都医科大学附属北京安定医院 国家精神心理疾病临床医学研究中心 精神疾病
诊断与治疗北京市重点实验室; 100069 北京, 首都医科大学人脑保护高精尖创新中心

通信作者: 郑毅, Email: yizheng@ccmu.edu.cn

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2022.09.005

【摘要】目的 应用甲基化芯片技术对注意缺陷多动障碍(ADHD)患儿DNA甲基化特征进行研究, 探讨DNA甲基化在ADHD发病机制中的作用。**方法** 于2018年10月至2019年5月选取在首都医科大学附属北京安定医院门诊确诊的8例8~16岁的儿童青少年ADHD患儿作为ADHD组; 招募8名年龄、性别与ADHD组匹配的健康儿童青少年作为对照组。采用Illumina Infinium Methylation EPIC Bead Chip芯片(850K芯片)技术对受试者进行全基因组DNA甲基化检测, 分析和筛选差异甲基化位点。采用gene ontology(GO)富集分析和pathway分析对筛选基因进行功能分类和通路分析。**结果** 与对照组比较, ADHD组共有2 068个CpG位点甲基化水平发生改变, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中有842个高甲基化位点, 1 226个低甲基化位点, 对应468个高甲基化基因如GPR88、ARHGAP10等, 对应705个低甲基化基因如SKI、PMP2、PRR12、EBF3、BRSK2等。GO富集分析显示, 差异甲基化基因参与生物学过程富集于系统发育、神经系统发育以及细胞黏附等。pathway分析显示, 差异甲基化基因与钙黏蛋白信号通路、神经元系统、Wnt信号通路、谷氨酸能突触等信号通路相关。**结论** DNA甲基化的异常参与了ADHD的发生发展, 检测出的差异甲基化基因可能成为ADHD的生物标志物或预测因子, 差异甲基化基因相关的信号通路可能与ADHD的发病机制相关。

【关键词】 注意缺陷多动障碍; 甲基化; 芯片分析技术; 基因组

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1306100); 北京市医院管理中心临床医学发展专项(ZYLX202128)

Genome-wide DNA methylation in peripheral blood of children and adolescents with ADHD Luo Jie, Zheng Yi

The National Clinical Research Center for Mental Disorders & Beijing Key Laboratory of Mental Disorders, Beijing An Ding Hospital, Capital Medical University, Beijing 100088, China; Advanced Innovation Center for Human Brain Protection, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: Zheng Yi, Email: yizheng@ccmu.edu.cn

【Abstract】Objective To study the characteristics of DNA methylation in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) using gene chip technology, and explore the role of DNA methylation in the pathogenesis of ADHD. **Methods** From October 2018 to May 2019, 8 children and adolescents aged 8 to 16, who were diagnosed with ADHD in the outpatient department of Beijing An Ding Hospital Affiliated to Capital Medical University were randomly selected as the ADHD group. 8 healthy children and adolescents matched with ADHD group in age and gender were recruited as the control group. The Illumina Infinium Methylation EPIC Bead Chip (850K chip) technology was used to perform genome-wide DNA methylation detection, analyze and screen differentially methylated sites. Gene ontology (GO) enrichment analysis and pathway analysis were used for functional classification and pathway analysis of screened genes. **Results** A total of 2 068 CpG sites were altered in the ADHD group compared to the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There were 842 hypermethylation sites, 1 226 hypomethylation sites, corresponding to 468 hypermethylation genes such as GPR88 and ARHGAP10, and 705 hypomethylation genes such as SKI, PMP2, PRR12, EBF3, BRSK2, etc. GO enrichment analysis showed that differentially methylated genes were involved in biological processes such as phylogeny, neurological development, cell adhesion, etc. Pathway analysis showed that the differentially methylated genes were related to signal pathways such as cadherin signal pathway, neuronal system, Wnt signal pathway, glutamatergic synapse, etc. **Conclusions** Abnormal DNA

methylation is involved in the occurrence and development of ADHD. The detected differential methylation genes may become biomarkers or predictors of ADHD. The signal pathways related to differential methylation genes may be related to the pathogenesis of ADHD.

【Key words】 Attention deficit disorder with hyperactivity; Methylation; Microchip analytical procedures; Genome

Fund programs: National Key Research and Development Program of China (2016YFC1306100); Beijing Hospitals Authority Clinical Medicine Development of Special Funding Support (ZYLX202128)

注意缺陷多动障碍(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)是一种神经发育障碍,主要临床表现为与年龄不相称的注意力不集中、注意的广度缩小、在多种场合下的过分活动,冲动并伴有学习认知相关困难^[1]。根据DSM-5关于儿童ADHD的诊断标准,在12岁之前达到症状诊断条目6条以上,症状持续6个月并伴有社会功能的损害即可诊断ADHD^[2]。ADHD发病率较高,根据流行病学调查研究显示,我国儿童青少年ADHD患病率高达6.4%^[3]。ADHD对于儿童青少年的影响深远,它起病早,持续时间长并会继发并发症。在未经治疗的情况下,30%~60%的患儿在成年后仍有损害症状^[4]。儿童青少年ADHD患者普遍学习成绩偏低、人际关系差,发生故意伤害、吸毒、抢劫等犯罪行为的比率较高^[1]。儿童青少年ADHD是国际上备受关注的疾病之一,ADHD相关的病因学研究在大量开展。

ADHD是一种多因素疾病,遗传率约为76%,除了常见的遗传变异外,最重要的因素之一是基因与环境的相互作用^[5]。相关研究证实某些环境危险因素可以通过影响表观遗传的改变导致大脑结构及神经元回路的异常而致病^[6]。表观遗传学是指在染色体基因的DNA碱基序列没有发生变化的情况下,基因的功能发生了变化,并导致了表型的改变,并且这种变化是可遗传的^[7]。DNA甲基化是目前研究较多的表观遗传方式,其为DNA的一种化学修饰形式,DNA甲基化过程中活性物质将甲基添加到DNA分子上导致染色质结构、DNA构象、DNA稳定性及DNA与蛋白质相互作用方式发生改变,从而控制基因表达^[8]。DNA甲基化在ADHD发生发展中的作用成为研究的热点。本研究使用Illumina Infinium Methylation EPIC Bead Chip芯片(850K芯片)技术检测ADHD患儿外周血全基因组DNA甲基化修饰水平,从而探究DNA甲基化修饰在ADHD发病中的作用。

一、对象与方法

1. 研究对象:于2018年10月至2019年5月在首都医科大学附属北京安定医院门诊招募确诊的8例ADHD儿童青少年患者纳入ADHD组。ADHD组纳入标准:(1)符合DSM-5中的ADHD诊断标准^[2],由2名副主任及以上精神科医师进行诊断;(2)年龄

8~16岁;(3)韦氏儿童智力测查评分>90分,病情稳定,可配合进行相关评估、检查;(4)患儿及其监护人签署知情同意书,理解并自愿参加本研究。社会招募8名性别、年龄相匹配的健康青少年作为对照组。对照组纳入标准:(1)由2名副主任及以上精神科医师根据DSM-5进行排除诊断;(2)两系三代亲属无精神疾病史;(3)年龄、性别与ADHD组匹配;(4)入组前3个月未使用过任何精神科药物;(5)韦氏儿童智力测查评分>90分,可配合进行相关评估、检查;(6)患儿及其监护人签署知情同意书,理解并自愿参加本研究。两组排除标准:(1)合并严重的躯体疾病;(2)合并精神发育迟滞、孤独谱系障碍等各种发育障碍;(3)合并精神分裂症、双相情感障碍等严重的精神疾病。本研究已通过首都医科大学附属北京安定医院伦理委员会批准(201743FS-2)。

2. 方法:(1)DNA提取及样本质检。抽取受试者空腹静脉血5 ml,抗凝管使用2%乙二胺乙酸;通过DNA试剂盒提取血样中基因组DNA(由北京博奥晶典公司提供技术支持)。利用分光光度计定量提取体积为20 μ l的DNA,浓度调整至标准浓度50 ng/ μ l,随后用0.8%的琼脂糖凝胶进行电泳。筛选能够进行DNA甲基化芯片试验的样品需要电泳结果显示主条带清晰,无明显降解,通常不小于10 kb,总量5 μ g以上。(2)亚硫酸盐转化。根据Illumina官方推荐的Zymo EZ DNA Methylation Kit优化方法进行亚硫酸盐转化。(3)DNA杂交与数据采集。在各个样本中加入0.1 N的NaOH,从而使DNA双链变性为单链,制备MSA3板,随后加入全基因组扩增试剂进行中和,使用限制性内切酶将扩增好的DNA进行片段化,利用异丙醇取得沉淀DNA片段,干燥后加入杂交缓冲试剂完成DNA重悬。重悬DNA样本与Illumina Infinium Methylation EPIC Bead Chip芯片在杂交炉中杂交。利用扫描仪进行荧光数据收集,整理信息得到原始数据,利用R包中的ChAMP对所得到的原始数据结果进行分析,从而得到所有样本中所有位点的甲基化水平数据。(4)数据质控。Illumina甲基化芯片质控过程包括非样本依赖型质控和样本依赖型质控,质控探针监测整个试验过程。①非样本依赖型质控(sample independent

control) 包括染色对照(staining controls)、延伸对照(extension controls)、杂交对照(hybridization controls)、目标去除对照(target removal controls), 用于评估试验操作步骤。②样品依赖质控(sample dependent control) 包括亚硫酸氢盐转化质控(bisulfite-conversion controls)、特异性质控(specificity controls)、非多态控件(nonpolymorphic controls)和阴性质控(negative controls), 用于评估样品质量。

3. 统计学方法: 将芯片原始扫描数据 idat 文件直接导入 R 包 ChAMP 进行分析, 获得每个位点的原始信号值和 Detection P 等信息^[9]。对数据进行位点质控, 要求位点 bead count ≥ 3 且 Detection $P < 0.05$ 在 95% 以上的个体中实现, 同时去除位于 X、Y 染色体及 SNP 上的位点^[10]; 个体质控要求个体的 Detection $P < 0.05$ 在 95% 以上位点中实现。使用 beta-mixture quantile normalization 对探针类型偏倚 (probe type bias) 进行校正, 得到最终可用于差异分析的甲基化水平 (β 值)^[9]。基于校正后的甲基化水平, 采用 R 包 Limma 3.32.10 进行差异甲基化分析^[11], 同时针对多重假设检验问题计算 FDR 校正的 P 值, 然后根据 P 值筛选差异位点, 采用 moderated t -statistics 和 empirical Bayes 方法检验差异位点的显著性。采用 Bumphunter 方法寻找差异甲基化区域^[12]。采用 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery 6.8 (DAVID 数据库) 对差异甲基化位点所对应的基因分子功能生物学过程进行 gene ontology (GO) 富集分析, 包括细胞组分、分子功能、生物学过程。采用 KEGG 数据库对差异甲基化位点对应的基因进行 pathway 分析。计数资料采用频数表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 正态分布的计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 两组受试者一般资料比较: ADHD 组与对照组的年龄 [(11.38 \pm 1.41) 岁比 (10.63 \pm 1.06) 岁]、性别 (男/女) [(6/2) 例比 (6/2) 名] 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2. 两组受试者差异甲基化位点分析: 与对照组比较, ADHD 组有 2 068 个位点的甲基化水平发生改变, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中有 842 个上调甲基化位点, 1 226 个下调甲基化位点。Delta beta 绝对值越大说明甲基化水平差异越大, 根据 Delta beta 绝对值 > 0.18 , 挑选出差异常甲基化位点及其所对应的基因, 见表 1。根据差异分析得到的 P 值与 Delta beta 值, 绘制火山图显示 ADHD 组甲基化基因差异性, 见图 1 (见本期封三)。根据差异甲基化位点

在两组中表达出的不同甲基化水平绘制热图, 见图 2 (见本期封三)。

3. GO 富集分析与 pathway 分析: GO 富集分析结果显示, 基因多富集在系统发育、多细胞生物体的发育、解剖结构的发育、细胞黏附以及神经系统发育等生物过程, 见图 3。pathway 分析结果显示, ADHD 组的差异甲基化基因与钙黏蛋白信号通路、神经元系统、谷氨酸能突触、Wnt 信号通路等信号通路相关, 见图 4。

讨论 全基因组甲基化分析是一种无假说的方式, 通过对 99% 的启动子和 95% CpG 岛的检测以确定基因与疾病之间的关系, 找到潜在的生物标志物。本研究结果显示, 关键基因 PMP2、SKI、RGS14、PRR12、EBF3、BRK2 的甲基化水平低表达, 基因 GPR88、ARHGEF10 的甲基化水平高表达可能参与 ADHD 的发病。在低甲基化基因中, Walton 等^[13] 在研究中发现 SKI 低甲基化水平改变与 ADHD 相关, 与本研究结果一致。SKI、PMP2 (髓鞘蛋白 P2) 都是参与髓鞘形成并保持髓鞘稳定性的重要蛋白^[14-16]。髓鞘化异常会导致电信号传递的紊乱, 临床上表现为注意力不集中^[17]。RGS14 基因主要分布在大脑海马的 CA2 区, 是学习和记忆信号途径的关键调控蛋白^[18-19]。PRR12 基因可能在神经发育中起作用^[20]; EBF3 是中枢神经系统发育所需的早期 B 细胞因子 (COE) 系列的成员, COE 蛋白在发育过程中具有调节神经元迁移、轴突传导和树突生成等功能^[21], 这些基因的甲基化异常可能导致相关蛋白表达异常, 从而影响神经系统发育, 参与 ADHD 的发病。而高甲基化基因 GPR88、ARHGEF10 中, GPR88 基因主要编码 G 蛋白偶联受体, 几乎完全在纹状体中表达, Thomson 等^[22] 的研究表明, GPR88 基因在皮质-纹状体-丘脑回路中起重要作用, 与工作记忆的受损、学习障碍相关。ARHGEF10 基因与社交行为相关, Lu 等^[23] 的研究发现, ARHGEF10 基因敲除的小鼠出现社交障碍、多动性等表现。有关 ADHD 甲基化的研究还处于早期, 既往研究中明确证实与 ADHD 发病相关的异常甲基化基因较少, 而本研究所发现的甲基化水平异常的基因涉及神经元发育多个方面, 有助于揭示 DNA 甲基化在 ADHD 发病机制中的作用, 上述差异甲基化基因也有望成为判别 ADHD 发病、进展和疾病严重程度的生物标志物或预测因子。

本研究通过 GO 富集分析以及 pathway 分析发现差异甲基化基因与谷氨酸能突触、钙黏蛋白信号通路以及 Wnt 信号通路等相关。ADHD 作为一种神经发育障碍, 与神经元的发育异常密不可分。既往研究证实谷氨酸能神经元的异常与 ADHD 的发病相关^[24]。

表1 注意缺陷多动障碍组差异甲基化位点信息

探针序号	Delta beta 值	染色体	基因名	在基因中的位置	CpG岛在染色体上的位置	甲基化水平变化
cg17682313	0.41771351	4	FBXW7	5' UTR	-	上调
cg08624915	0.31116906	16	AHSP	TSS1500	-	上调
cg14279361	0.30887752	19	C3	TSS1500	-	上调
cg19142181	0.29243655	20	SLC17A9	Body	chr20: 61590816-61591210	上调
cg13571460	0.22707875	9	LHX6	Body	chr9: 124987743-124991086	上调
cg06223162	0.22222985	1	GPR88	TSS200	chr1: 101004471-101005885	上调
cg09812376	0.21182526	17	QRICH2	3' UTR	-	上调
cg13422161	0.20045033	12	KRT84	Body	-	上调
cg17221813	0.19664215	20	SLC17A9	Body	chr20: 61590816-61591210	上调
cg24804488	0.19016883	8	ARHGEF10	Body	-	上调
cg27237671	0.18893861	2	TMEM18	Body	chr2: 676651-677678	上调
cg16896144	0.18855615	2	CRIM1	Body	-	上调
cg24800175	0.18784766	19	CACNA1A	Body	chr19: 13346962-13347346	上调
cg09843519	0.18671791	5	ALDH7A1	TSS1500	chr5: 125930601-125931049	上调
cg08208480	-0.18014635	11	BRSK2	Body	chr11:1410119-1412346	下调
cg15132013	-0.18164537	1	SKI	Body	chr1:2158212-2161173	下调
cg09781943	-0.1823801	19	ANKRD24	Body	chr19: 4198017-4198654	下调
cg14859874	-0.1867373	1	UBAP2L	Body	-	下调
cg15046585	-0.1907837	15	CRTC3	TSS1500	chr15: 91072689-91073976	下调
cg04238311	-0.1936255	11	GYLTL1B	Body	chr11: 45943513-45944852	下调
cg09845489	-0.1955382	7	PTPRN2	Body	chr7: 157666069-157666399	下调
cg06060754	-0.2000613	5	RGS14	Body	chr5: 176793959-176794841	下调
cg05867245	-0.2133239	20	ZBTB46	Body	chr20: 62402042-62403097	下调
cg19301273	-0.2466408	8	PMP2	TSS1500	-	下调
cg04043455	-0.2623682	10	EBF3	Body	chr10: 131666016-131666315	下调
cg07599136	-0.3043929	5	AHRR	Body	-	下调
cg06378142	-0.3070716	19	PRR12	Body	chr19: 50119223-50119476	下调
cg05872034	-0.3100617	1	NPHP4	Body	-	下调
cg17509989	-0.3168109	5	RGS14	Body	chr5: 176793959-176794841	下调
cg16955800	-0.3522070	2	NUP35	TSS1500	-	下调
cg09293560	-0.3683602	7	REPIN1	TSS200	chr7: 150068756-150070051	下调

注: -无数据

Kim等^[25]的研究发现编码离子型谷氨酸受体的GRIN2A基因外显子5的多态性与ADHD呈显著相关,GRIN2B基因与ADHD患者神经认知损害的易感性增加有关,其表达的异常可能影响大脑局部功能连接受损。Elia等^[26]的研究发现,多达10%的ADHD患者可能存在谷氨酸受体网络变异。本研究结果显示,差异甲基化基因富集在谷氨酸能突触通路上,其中包括许多编码谷氨酸受体的基因,如GRIK2基因(动物试验中证实与冲动性、攻击性相关)^[27]、GRIK4基因(影响杏仁核回路中突触传递的效率,影响神经回路的整体性能,与精神疾病的异常行为相关)^[28]、GRM8基因(在既往研究中证实与精神分裂症、孤独症、酒精依赖等精神疾病相关)^[29-31]。因此,上述差异甲基化基因可能导致多种谷氨酸受体表达异常,影响谷氨酸能神经元的正常功能,从

而参与到ADHD的发病中。

此外,差异甲基化基因显著富集在钙黏蛋白信号通路,钙黏蛋白在神经网络形成过程中参与突触小泡的移动、控制突触受体的稳定性、调节成熟突触的功能,在神经发育中起重要作用^[32]。全基因组关联研究(genome wide association studies, GWAS)提示钙黏蛋白家族基因与ADHD相关,其中CDH13被验证与ADHD的发展有着密切的关系^[33]。富集在钙黏蛋白通路上的差异甲基化基因多数属于原钙黏蛋白家族,此家族与许多精神障碍相关,但本研究结果显示其还与ADHD相关。Lachman等^[34]的研究发现PCDH α 基因簇可变外显子的16.7 kb缺失片段可能是精神分裂症和双相情感障碍的风险遗传位点。Anitha等^[35]在PCDH α 基因簇中发现5个与孤独症谱系障碍显著关联的单核苷酸多态

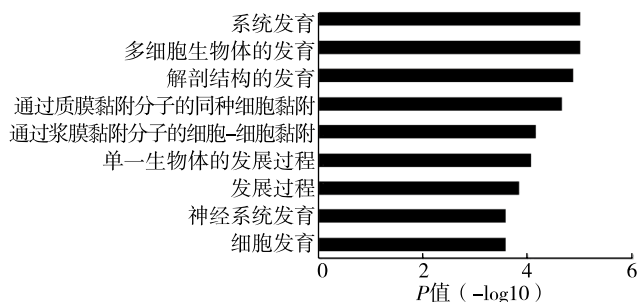


图3 注意缺陷多动障碍组与对照组 gene ontology 富集分析

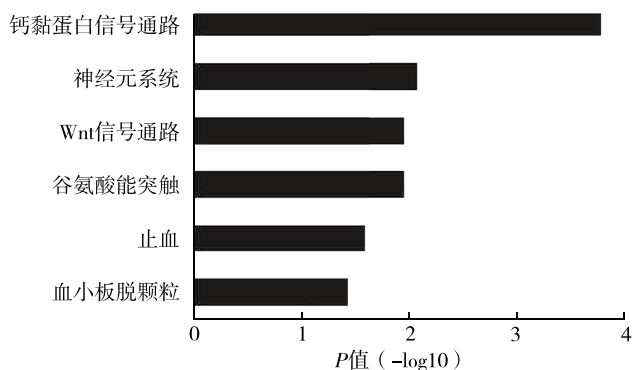


图4 注意缺陷多动障碍组与对照组 pathway 分析

性位点(rs251379、rs1119032、rs17119271、rs155806、rs17119346)。Roberson-Nay等^[36]利用表观组关联分析发现,同卵双胞胎的早期抑郁症可能与PCDH α 基因簇有关。

Wnt信号通路在发育过程中调节神经前体细胞增殖和分化过程的平衡,影响成熟大脑中神经干细胞的增殖和分化,并对树突和棘突的成熟起到支持作用,在神经发育方面起到重要作用^[37]。既往研究支持Wnt通路与ADHD相关,在GWAS中发现经典Wnt通路中KCNIP4基因与ADHD相关^[38]。经典Wnt信号与学习和记忆,特别是与工作记忆和空间记忆的缺陷相关^[39]。一项研究证明盐酸哌甲酯通过Wnt信号转导影响细胞增殖和分化,促进神经元成熟^[40]。此外,Wnt通路与钙黏蛋白之间存在密切联系。在经典通路中 β -连环蛋白(β -catenin)与钙黏蛋白结合成为复合体,使细胞表面黏附受体(如E-钙黏蛋白)连接到细胞骨架上,参与细胞黏附过程,而当钙黏蛋白在细胞表面不表达, β -catenin会被解放出来,进而转位入核,启动转录,激活经典Wnt通路。在非经典通路Wnt/Ca²⁺通路中,通过层级信号转导调整细胞Ca²⁺浓度从而影响钙黏蛋白从而调控细胞黏附^[41]。因此,钙黏蛋白家族差异甲基化基因可能影响突触发育、神经网络的形成,通过钙黏蛋白信号通路、Wnt信号通路等多种信号通路

影响神经元的正常发育,在ADHD的发生机制中起重要作用,但其中的交互机制需要进一步探索。

本研究的局限性与不足:本研究纳入样本量较少,后期需要扩大样本量验证试验的可靠性。本研究未对发现的差异甲基化基因的表达水平进行测定及验证,在后续试验中将扩大样本量对基因表达的蛋白及mRNA进行验证分析,并且对钙黏蛋白家族相关基因在钙黏蛋白信号通路及Wnt信号通路中的作用机制进行深入探讨验证,从而为DNA甲基化在ADHD发病机制的研究提供有力依据。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 试验设计、数据收集、论文撰写为罗杰,试验指导、论文修改、审校为郑毅

参 考 文 献

- [1] Posner J, Polanczyk GV, Sonuga-Barke E. Attention-deficit hyperactivity disorder[J]. Lancet, 2020, 395(10222): 450-462. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)33004-1.
- [2] American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders[M]. 5th ed. Washington DC: American Psychiatric Association, 2013.
- [3] Li F, Cui Y, Li Y, et al. Prevalence of mental disorders in school children and adolescents in China: diagnostic data from detailed clinical assessments of 17, 524 individuals[J]. J Child Psychol Psychiatry, 2022, 63(1): 34-46. DOI: 10.1111/jcpp.13445.
- [4] Weibel S, Menard O, Ionita A, et al. Practical considerations for the evaluation and management of attention deficit hyperactivity disorder(ADHD) in adults[J]. Encephale, 2020, 46(1): 30-40. DOI: 10.1016/j.encep.2019.06.005.
- [5] Brikell I, Burton C, Mota NR, et al. Insights into attention-deficit/hyperactivity disorder from recent genetic studies[J]. Psychol Med, 2021, 51(13): 2274-2286. DOI: 10.1017/S0033291721000982.
- [6] Silk T, Dipnall L, Wong YT, et al. Epigenetics and ADHD[J]. Curr Top Behav Neurosci, 2022, DOI: 10.1007/7854_2022_339.
- [7] Bošković A, Rando OJ. Transgenerational epigenetic inheritance[J]. Annu Rev Genet, 2018, 52: 21-41. DOI: 10.1146/annurev-genet-120417-031404.
- [8] Singer BD. A practical guide to the measurement and analysis of DNA methylation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019, 61(4): 417-428. DOI: 10.1165/ajrmb.2019-0150TR.
- [9] Teschendorff AE, Marabita F, Lechner M, et al. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data[J]. Bioinformatics, 2013, 29(2): 189-196. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts680.
- [10] Zhou W, Laird PW, Shen H. Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(4): e22. DOI: 10.1093/nar/gkw967.
- [11] Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments[J]. Stat Appl Genet Mol Biol, 2004, 3: Article3. DOI: 10.2202/1544-6115.1027.
- [12] Jaffe AE, Murakami P, Lee H, et al. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology

- studies [J]. *Int J Epidemiol*, 2012, 41(1): 200-209. DOI: 10.1093/ije/dyr238.
- [13] Walton E, Pingault JB, Cecil CA, et al. Epigenetic profiling of ADHD symptoms trajectories: a prospective, methylome-wide study [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(2): 250-256. DOI: 10.1038/mp.2016.85.
- [14] Geroldi A, Prada V, Veneri F, et al. Early onset demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease caused by a novel inframe isoleucine deletion in peripheral myelin protein 2 [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2020, 25(2): 102-106. DOI: 10.1111/jns.12375.
- [15] Chelyshev YA, Muhamedshina YO, Povysheva TV, et al. Characterization of spinal cord glial cells in a model of hindlimb unloading in mice [J]. *Neuroscience*, 2014, 280: 328-339. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.004.
- [16] Maoz O, Tkačik G, Esteki MS, et al. Learning probabilistic neural representations with randomly connected circuits [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(40): 25066-25073. DOI: 10.1073/pnas.1912804117.
- [17] Benamer N, Vidal M, Balia M, et al. Myelination of parvalbumin interneurons shapes the function of cortical sensory inhibitory circuits [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5151. DOI: 10.1038/s41467-020-18984-7.
- [18] Squires KE, Gerber KJ, Tillman MC, et al. Human genetic variants disrupt RGS14 nuclear shuttling and regulation of LTP in hippocampal neurons [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100024. DOI: 10.1074/jbc.RA120.016009.
- [19] Masmudi-Martín M, Navarro-Lobato I, López-Aranda MF, et al. RGS14(414) treatment induces memory enhancement and rescues episodic memory deficits [J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 11804-11820. DOI: 10.1096/fj.201900429RR.
- [20] Chowdhury F, Wang L, Al-Raqad M, et al. Haploinsufficiency of PRR12 causes a spectrum of neurodevelopmental, eye, and multisystem abnormalities [J]. *Genet Med*, 2021, 23(7): 1234-1245. DOI: 10.1038/s41436-021-01129-6.
- [21] Iwai R, Tabata H, Inoue M, et al. A Prdm8 target gene Ebf3 regulates multipolar-to-bipolar transition in migrating neocortical cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 388-394. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.021.
- [22] Thomson DM, Openshaw RL, Mitchell EJ, et al. Impaired working memory, cognitive flexibility and reward processing in mice genetically lacking Gpr88: evidence for a key role for Gpr88 in multiple cortico-striatal-thalamic circuits [J]. *Genes Brain Behav*, 2021, 20(2): e12710. DOI: 10.1111/gbb.12710.
- [23] Lu DH, Liao HM, Chen CH, et al. Impairment of social behaviors in Arhgef10 knockout mice [J]. *Mol Autism*, 2018, 9: 11. DOI: 10.1186/s13229-018-0197-5.
- [24] Medin T, Jensen V, Skare Ø, et al. Altered α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor function and expression in hippocampus in a rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 360: 209-215. DOI: 10.1016/j.bbr.2018.12.028.
- [25] Kim JI, Kim JW, Park S, et al. The GRIN2B and GRIN2A gene variants are associated with continuous performance test variables in ADHD [J]. *J Atten Disord*, 2020, 24(11): 1538-1546. DOI: 10.1177/1087054716649665.
- [26] Elia J, Ungal G, Kao C, et al. Fasoracetam in adolescents with ADHD and glutamatergic gene network variants disrupting mGluR neurotransmitter signaling [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4. DOI: 10.1038/s41467-017-02244-2.
- [27] Ma H, Xun G, Zhang R, et al. Correlation between GRIK2 rs6922753, rs2227283 polymorphism and aggressive behaviors with Bipolar Mania in the Chinese Han population [J]. *Brain Behav*, 2019, 9(11): e01449. DOI: 10.1002/brb3.1449.
- [28] Arora V, Pecoraro V, Aller MI, et al. Increased Grik4 gene dosage causes imbalanced circuit output and human disease-related behaviors [J]. *Cell Rep*, 2018, 23(13): 3827-3838. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.05.086.
- [29] Bauer LO, Covault JM. GRM8 genotype is associated with externalizing disorders and greater inter-trial variability in brain activation during a response inhibition task [J]. *Clin Neurophysiol*, 2020, 131(6): 1180-1186. DOI: 10.1016/j.clinph.2020.02.031.
- [30] Li W, Ju K, Li Z, et al. Significant association of GRM7 and GRM8 genes with schizophrenia and major depressive disorder in the Han Chinese population [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2016, 26(1): 136-146. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2015.05.004.
- [31] Li H, Li Y, Shao J, et al. The association analysis of RELN and GRM8 genes with autistic spectrum disorder in Chinese Han population [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2008, 147B(2): 194-200. DOI: 10.1002/ajmg.b.30584.
- [32] Dewitz C, Duan X, Zampieri N. Organization of motor pools depends on the combined function of N-cadherin and type II cadherins [J]. *Development*, 2019, 146(13): dev180422. DOI: 10.1242/dev.180422.
- [33] Kiser DP, Popp S, Schmitt-Böhrer AG, et al. Early-life stress impairs developmental programming in Cadherin 13 (CDH13)-deficient mice [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2019, 89: 158-168. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2018.08.010.
- [34] Lachman HM, Petruolo OA, Pedrosa E, et al. Analysis of protocadherin alpha gene deletion variant in bipolar disorder and schizophrenia [J]. *Psychiatr Genet*, 2008, 18(3): 110-115. DOI: 10.1097/YPG.0b013e3282fa1838.
- [35] Anitha A, Thanseem I, Nakamura K, et al. Protocadherin α (PCDHA) as a novel susceptibility gene for autism [J]. *J Psychiatry Neurosci*, 2013, 38(3): 192-198. DOI: 10.1503/jpn.120058.
- [36] Roberson-Nay R, Lapato DM, Wolen AR, et al. An epigenome-wide association study of early-onset major depression in monozygotic twins [J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1): 301. DOI: 10.1038/s41398-020-00984-2.
- [37] Mulligan KA, Cheyette BN. Neurodevelopmental perspectives on Wnt signaling in psychiatry [J]. *Mol Neuropsychiatry*, 2017, 2(4): 219-246. DOI: 10.1159/000453266.
- [38] Bonvicini C, Faraone SV, Scassellati C. Common and specific genes and peripheral biomarkers in children and adults with attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *World J Biol Psychiatry*, 2018, 19(2): 80-100. DOI: 10.1080/15622975.2017.1282175.
- [39] Grünblatt E, Nemoda Z, Werling AM, et al. The involvement of the canonical Wnt-signaling receptor LRP5 and LRP6 gene variants with ADHD and sexual dimorphism: association study and meta-analysis [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2019, 180(6): 365-376. DOI: 10.1002/ajmg.b.32695.
- [40] Grünblatt E, Bartl J, Walitza S. Methylphenidate enhances neuronal differentiation and reduces proliferation concomitant to activation of Wnt signal transduction pathways [J]. *Transl Psychiatry*, 2018, 8(1): 51. DOI: 10.1038/s41398-018-0096-8.
- [41] van der Wal T, van Amerongen R. Walking the tight wire between cell adhesion and WNT signalling: a balancing act for β -catenin [J]. *Open Biol*, 2020, 10(12): 200267. DOI: 10.1098/rsob.200267.

(收稿日期: 2022-03-24)

(本文编辑: 赵金鑫)