DOI:10.16016/j.2097-0927.202109083

# 3 对不同抑郁表型青少年同卵双生子的差异甲基化研究

易 立[1],侯 枭[2],杨 舒[1],赵连生[3],陈晓鹭[1],邓 伟[4],陈界衡[1],唐伟杰[1],张书弟[1],傅一笑[1] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院精神科[1];401331 重庆,重庆医药高等专科学校临床医学院[2];610041 成都,四川大学华西医院精神医学研究室,心理卫生中心[3];310000 杭州,杭州市第七人民医院物理诊疗中心[4]

[摘要] **目的** 对同卵不同抑郁表型双生子外周血 DNA 甲基化差异进行筛查,探讨差异基因是否可作为参与抑郁发生的候选基因。**方法** 募集在校青少年双生子并进行卵形鉴定。以贝克抑郁量表第 2 版(Beck Depression Inventory-Ⅱ,BDI-Ⅱ)、长处与困难问卷(Strengths and Difficulties Questionnaire,SDQ)学生版本的情绪因子得分确定双生子个体间的抑郁表型差异。850k 甲基化测序后选取 $P<0.05$、且甲基化 β 值差值绝对值大于 0.1($|\Delta\beta|>0.1$)为差异甲基化位点。进行基因本体论(GO)功能注释分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,以及蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,以识别与抑郁症(major depressive disorder,MDD)相关的重要基因及其甲基化水平改变。**结果** 纳入同卵不同抑郁表型青少年双生子 3 对,分为抑郁表型组和正常表型组,两组间共筛选出 57 个有甲基化水平差异基因,其中 45 个基因 DNA 甲基化水平升高,12 个基因 DNA 甲基化水平降低。GO 分析显示差异基因在中枢神经系统发育、RNA 代谢过程调控等生物学过程富集显著,KEGG 分析发现其在突触长时程抑制(LTD)、PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路有明显富集。而在 PPI 网络中发现 RHOA 与多个差异甲基化基因存在直接或间接相互作用。**结论** 在同卵不同抑郁表型双生子外周血中存在 CSF1R、NOS1、AHR 等基因的 DNA 甲基化水平改变,可能调节基因表达并通过 LTD、PI3K-Akt 等信号通路参与抑郁发生。

[关键词] DNA 甲基化;抑郁;双生子;青少年

[中图法分类号] R394.1;R446.119;R749.4 [文献标志码] A

# Methylation differences in 3 pairs of identical twin adolescents with different depressive phenotypes

YI Li[1], HOU Xiao[2], YANG Shu[1], ZHAO Liansheng[3], CHEN Xiaolu[1], DENG Wei[4], CHEN Jieheng[1], TANG Weijie[1], ZHANG Shudi[1], FU Yixiao[1] [1]Department of Psychiatry, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Clinical Medicine, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing, 401331; [3]Mental Health Center, Department of Psychiatric Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041; [4]Physiotherapy Center, Hangzhou Seventh People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang Province, 310000, China

[**Abstract**] Objective To investigate the differences of peripheral blood DNA methylation in identical twin adolescents with different depressive phenotypes and explore whether these differentially expressed genes can be used as candidate genes involved in the occurrence of depression. Methods Three pairs of verified identical twin adolescents (12 ~ 18 years old) were recruited in this study. Phenotypic differences of depression between the twins were determined by Beck Depression Inventory-Ⅱ (BDI-Ⅱ) scores and emotional factor scores of Strength and Difficulty Questionnaire (SDQ) for students. After Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit was used to interrogate over 850k methylation sites, those with $P<0.05$ and the absolute value difference of methylation β value greater than 0.1 ($|\triangle\beta|>0.1$) were selected as the

[基金项目] 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2018jcyjAX0252);重庆市卫生和计划生育委员会与重庆市科学技术委员会联合项目(2019MSXM045)

[通信作者] 傅一笑,E-mail:fuyixiaoresearch@126.com

2097-0927/Copyright © 2022,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

differential methylation sites. Gene Ontology (GO) functional annotation analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, as well as protein-protein interaction (PPI) network were performed to identify important genes associated with major depressive disorder (MDD) and their methylation changes. **Results** Three pairs of identical twin adolescents with different depressive phenotypes were divided into depressive phenotype group and normal phenotype group. A total of 57 genes with different methylation levels were screened between the 2 groups, including 45 genes with increased and 12 genes with decreased DNA methylation levels. GO analysis showed that differential genes were most significantly enriched in biological processes such as central nervous system development and regulation of RNA metabolic process. KEGG analysis indicated that differential genes were significantly enriched in synaptic long-term depression (LTD), PI3K-Akt signaling pathway and TNF signaling pathway. Besides, direct or indirect interactions between RHOA and several differential methylated genes were found in PPI network. **Conclusion** Changes in DNA methylation levels of CSF1R, NOS1, AHR and other genes in peripheral blood of identical twins with different depressive phenotypes may regulate gene expression through synaptic long-term depression (LTD), PI3C-Akt and other signaling pathways involved in the occurrence of depression.

[**Key words**] DNA methylation; depression; twins; adolescents

Supported by the Project of Basic Science and Frontier Technology Research of Chongqing (cstc2018jcyjAX0252) and the Joint Project of Chongqing Science and Technology Commettee and Chongqing Health Commettee (2019MSXM045). Corresponding author: FU Yixiao, E-mail: fuyixiaoresearch@126.com

抑郁症(major depressive disorder,MDD)是一种以情绪低落、兴趣减退、思维迟缓为主要表型的一种心境障碍,严重时可导致患者自杀行为[1]。与成年抑郁症相比,儿童青少年抑郁症患病率和自杀率更高,然而诊断却仍基于临床表型,缺乏客观有效生物标记物[2]。研究表明,虽然抑郁症受到遗传因素的影响,但其并不能完全解释该疾病的发生[3]。表观遗传修饰机制的提出为抑郁症的发生提供了新的研究方向,即疾病发生与发展过程可以通过环境-基因相互作用,环境调节基因表达。而 DNA 甲基化作为表观遗传修饰较早发现且稳定常见的方式,被认为可能成为抑郁症诊治的生物标记物[4]。但 DNA 甲基化在青少年抑郁群体中的研究并不多,同卵双生子具有相同的遗传基因,在保证遗传度一致的前提下,双生子中的表型不同或与环境因素导致 DNA 甲基化水平差异相关。一项关于多发性硬化症(multiple sclerosis,MS)的研究纳入 3 对表型不一致的同卵双生子进行表观遗传学研究[5],而另一项对于精神分裂症的研究则纳入 2 对同卵不共患精神分裂症的双生子,并获得了疾病相关差异基因和重要网络[6]。因此,本研究纳入不同抑郁表型双生子进行 850k 甲基化芯片分析,观察在同卵不同表型青少年双生子中 DNA 甲基化水平的差异,探讨抑郁发生的相关基因,为进一步的环境调节效应和信号通路研究提供思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象及方案

本研究经重庆医科大学伦理委员会批准(2016-149)。经重庆市教委及所辖各中小学校授权,获得双生子资料,募集青少年在校双生子。纳入标准:①12~18 岁;②无躯体疾病、精神疾病及认知功能障碍。所有受试者本人及其法定监护人签署书面知情同意书。

研究纳入 3 对不同抑郁表型的青少年双生子,根据卵形鉴定明确为同卵双生子,采用贝克抑郁自评量表(Beck Depression Inventory-Ⅱ,BDI-Ⅱ)和长处与困难问卷(Strengths and Difficulties Questionnaire,SDQ)的学生问卷中情绪症状因子进行评估。以 BDI-Ⅱ得分大于 14 分为界,判断 1 对双生子中 1 人为无抑郁状态,1 人为抑郁状态。使用 SDQ 情绪症状因子得分≥4 分验证抑郁状态的存在。采集同卵双生子外周血 DNA 进行 850k 甲基化芯片(illumina infinium methylation epic bead chip)分析差异甲基化位点。

### 1.2 双生子卵型鉴定

用 K2EDTA 抗凝管采集静脉血 4 mL,-30 ℃冰箱速冻后提取 DNA。采用 AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit 试剂盒(ABI 公司)检测 15 个短串联重复序列(short tandem repeat, STR)位点(D8S1179、D21S11、D7S820、CSF1PO、D3S1358、TH01、D13S317、D16S539、D2S1338、D19S433、vWA、TPOX、D18S51、FGA、D5S818)及牙釉蛋白基因(Amelogenin)进行卵型鉴定(ABI Prism® 3100 遗传分析仪,ABI 公司,美国)。

### 1.3 评估工具

1.3.1 贝克抑郁量表第 2 版(Beck Depression Inventory-Ⅱ,BDI-Ⅱ) 该量表包含 21 项条目,每项条目评分为 0~3 分,总分为 63 分。评分标准:无抑郁

0~13 分、轻度抑郁 14~19 分、中度抑郁 20~28 分、重度抑郁 29~63 分。该量表虽广泛运用于成年人中,在青少年中仍具有良好的信度与效度[7]。以 14 分为界判断是否存在抑郁状态。

1.3.2 长处与困难问卷(Strengths and Difficulties Questionnaire,SDQ) 该量表可用于评估儿童青少年的行为与情绪问题,具有良好的信度与效度[8]。问卷分家长、老师和学生自评 3 个版本,本研究选取学生自评版本,以得分≥4 分作为存在抑郁的分界。

1.4 DNA 提取与保存

使用北京百泰克(BioTeke Corporation)大量全血基因组 DNA 提取试剂盒(A large quantity whole blood genome DNA isolation kit),按照说明书提取全血中 DNA。对提取的 DNA 使用可见分光光度计(NanoDrop2000,美国赛默飞公司)测定含量。甲基化芯片 6 例样本 DNA 纯度[光密度值 $D(260)/D(280)$ 值]均在 1.8~1.9;浓度均≥200 ng/μL。将 DNA 放置于-80 ℃冰箱保存。

1.5 850k 甲基化芯片分析

使用 EZDNA 甲基化试剂盒(Zymo Research,USA)从 3 对 DNA 样本中提取约 500 ng 基因组 DNA 用于亚硫酸氢钠转化;之后经过扩增-断裂-沉淀-重悬,在 850k 芯片上行杂交-洗涤-延伸-染色-扫描,获取 DNA 甲基化信号。使用 R 中的 ChAMP 包进行分析,获得甲基化水平并对原始信号值进行标准化处理。

1.6 统计学分析

在得到均一化 β 值以后,使用 champ 包的 champ.DMP 函数(调用 limma 包的线性回归和 moderated *t*-test)进行组间的差异甲基化位点(DMP)分析。选取 $P<0.05$,且甲基化 β 值差值绝对值大于 0.1($|\Delta\beta|>0.1$)为差异甲基化位点。将两组间的差异甲基化位点对应的基因输入 OmicShare 6.3.0 在线数据库进行基因本体论(Gene Ontology,GO)功能注释分析及京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路富集分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。建立基于相互作用基因检索搜索工具(STRING)数据库和 Cytoscape3.8.2 软件的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,以识别与抑郁相关的重要基因。

## 2 结果

2.1 一般人口学特征及主要量表评估

twins_A01、twins_B01、twins_C01 作为对照组,twins_A02、twins_B02、twins_C02 作为抑郁表型组。BDI-Ⅱ、SDQ 量表评估结果显示:两组间一般人口学特征中,家庭结构、父母亲职业、教育水平、家庭平均月收入、居住类型等差异无统计学意义(表 1)。

**表 1 一般人口学特征及量表评估**

| 编号 | 年龄/岁 | 性别 | 抚养方式 | 父母关系 | BDI-Ⅱ评分 | SDQ评分 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| twins_A01 | 18 | 男 | 共同 | 和睦 | 2 | 0 |
| twins_A02 | 18 | 男 | 共同 | 和睦 | 16 | 6 |
| twins_B01 | 14 | 男 | 共同 | 和睦 | 6 | 0 |
| twins_B02 | 14 | 男 | 共同 | 和睦 | 17 | 4 |
| twins_C01 | 18 | 女 | 共同 | 和睦 | 4 | 0 |
| twins_C02 | 18 | 女 | 共同 | 和睦 | 24 | 8 |

2.2 外周血甲基化的分析

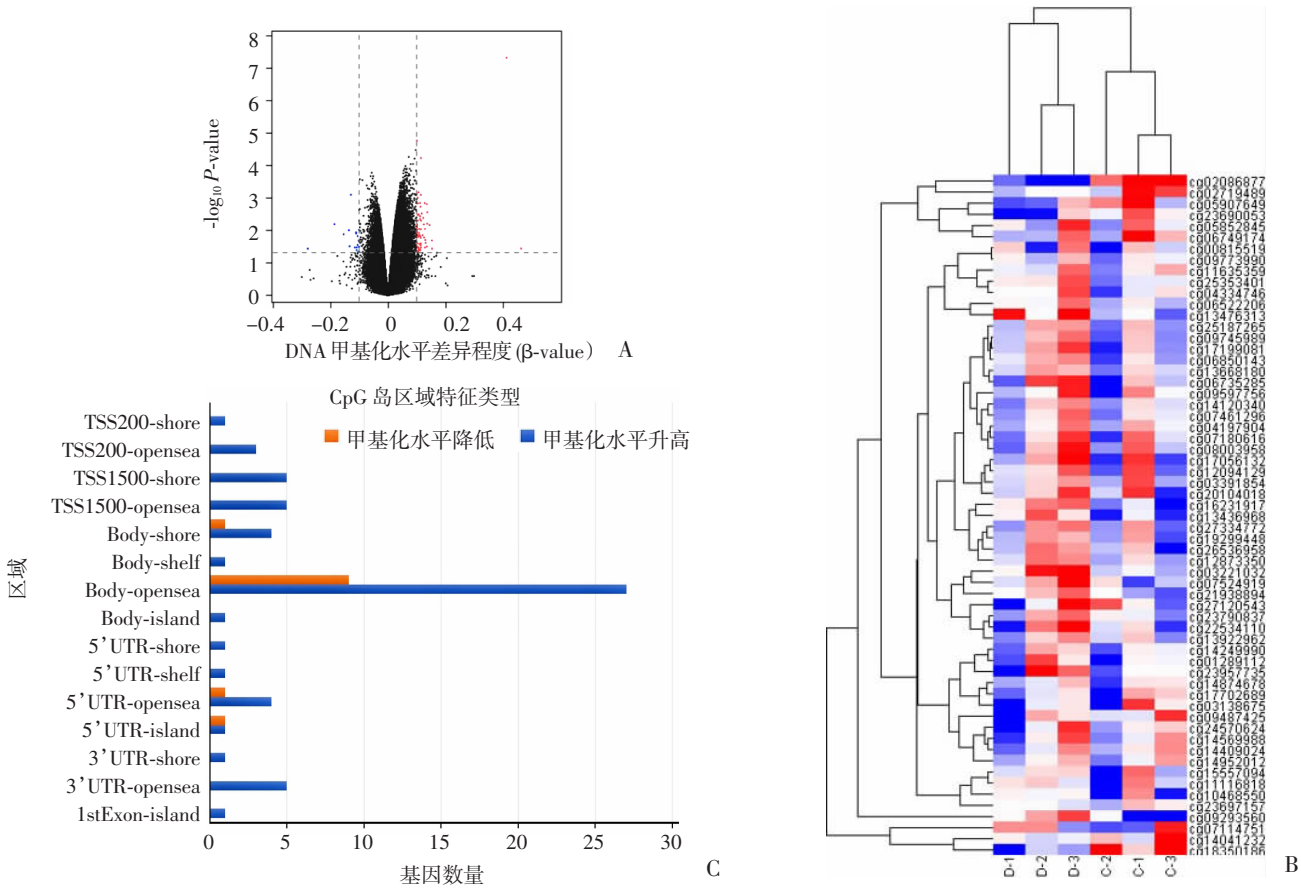
以 $P<0.05$、$|\Delta\beta|\geq0.1$ 为标准,与对照组比较,抑郁状态的双生子外周血中有 57 个甲基化水平差异基因,其中 12 个甲基化水平降低,45 个甲基化水平升高,甲基化水平改变主要位于基因内部 open sea 区域(Body-opensea),见图 1。

2.3 GO 富集分析

对甲基化水平升高和降低的基因分别进行 GO 富集分析,差异基因被富集到多个不同的 GO 子集中,包括生物学过程(biological process,BP)、细胞组分(cellular component,CC)和/或分子功能(molecular function,MF)3 个方面(图 2)。在甲基化水平升高的基因的 GO 富集中发现生物过程(biological process,BP)主要集中在大脑发育、中枢神经系统发育以及支持细胞的生长分化等,细胞组分主要集中在 CSF1-CSF1R 复合体、Ryanodine 受体复合物、蛋白磷酸酶 4 复合物等,分子功能主要集中在多核苷酸 5'-磷酸酶活性、巨噬细胞集落刺激因子受体活性、一氧化氮合酶活性、多核苷酸磷酸酶活性、支架蛋白结合等。在甲基化水平降低的基因的 GO 富集中发现生物过程主要集中在 RNA 代谢过程调节、基因表达正调控等,细胞组分主要集中在 C 芳烃受体复合体、细质转录因子复合体等,分子功能主要集中在泛素蛋白连接酶活性、翻译起始因子 2α 激酶活性、RNA 聚合酶Ⅱ转录因子结合等。

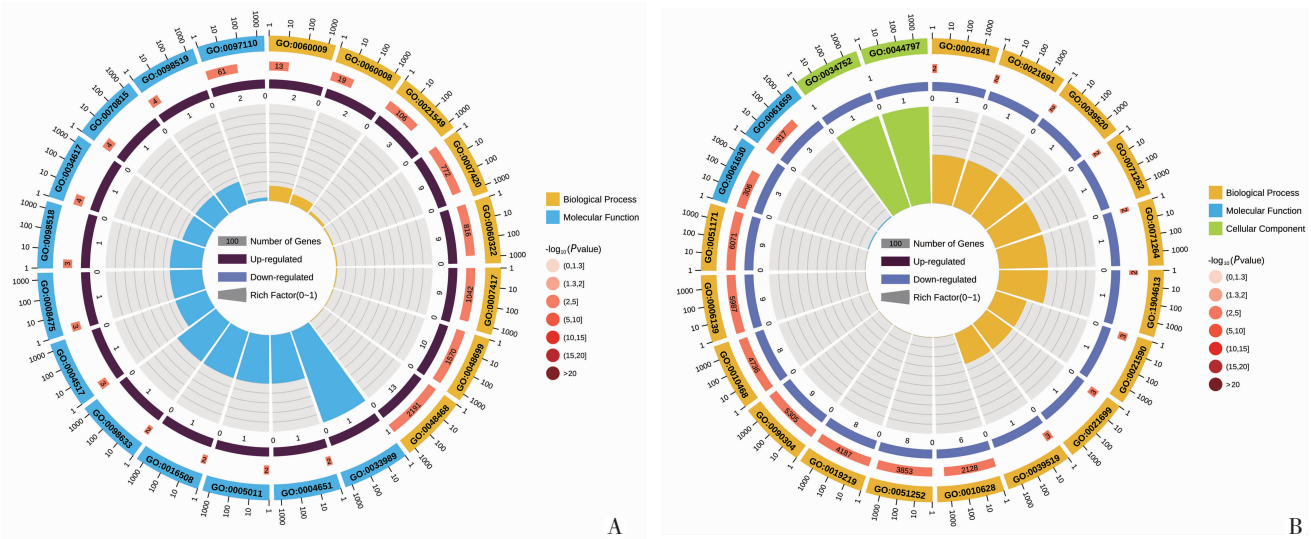
2.4 KEGG 富集分析

甲基化水平升高的基因的富集通路主要有突触长时程抑制(LTD)、ECM-受体交互作用、库欣综合征、精氨酸生物合成、不饱和脂肪酸的生物合成、PI3K-Akt 信号通路等。甲基化水平降低的富集通路主要有库欣综合征、皮质醇合成和分泌、TNF 信号通路等。见图 3。




A:火山图　蓝色示甲基化水平降低;红色示甲基化水平升高;B:热图　D-1、2、3 为抑郁状态双生子个体;C-1、2、3 为正常对照双生子个体;红色为甲基化水平升高;蓝色为甲基化水平降低;C:CpG 岛区域特征分布　橙色示甲基化水平降低主要区域;蓝色示基因甲基化水平升高主要区域

**图 1　甲基化水平差异基因的火山图、热图及区域分布**



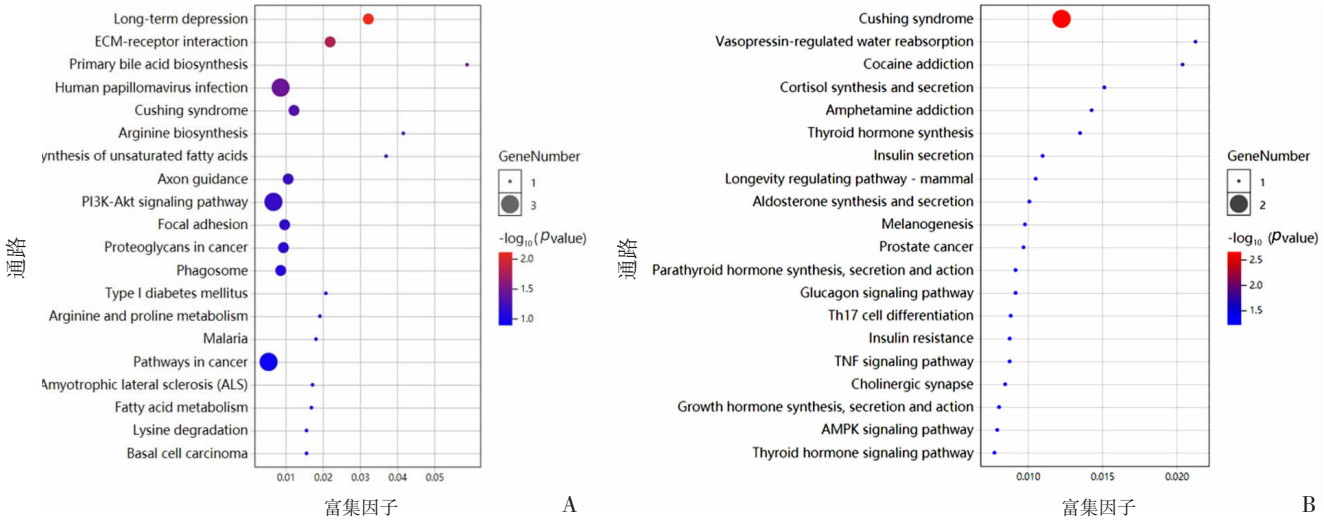

最外圈为富集的分类;圈外为基因数目的坐标尺;黄色示生物学过程;蓝色示分子功能;绿色示细胞组成;第二圈为背景基因中该分类的数目以及 *P* 值;第三圈为上下调基因比例条形图;第四圈为各分类的 Rich Factor 值

A:甲基化水平升高的基因 GO 富集;B:甲基化水平降低的 GO 富集

**图 2　甲基化水平升高/降低的基因的 GO 富集分析**　（前 20 位）

2.5 蛋白质相互作用

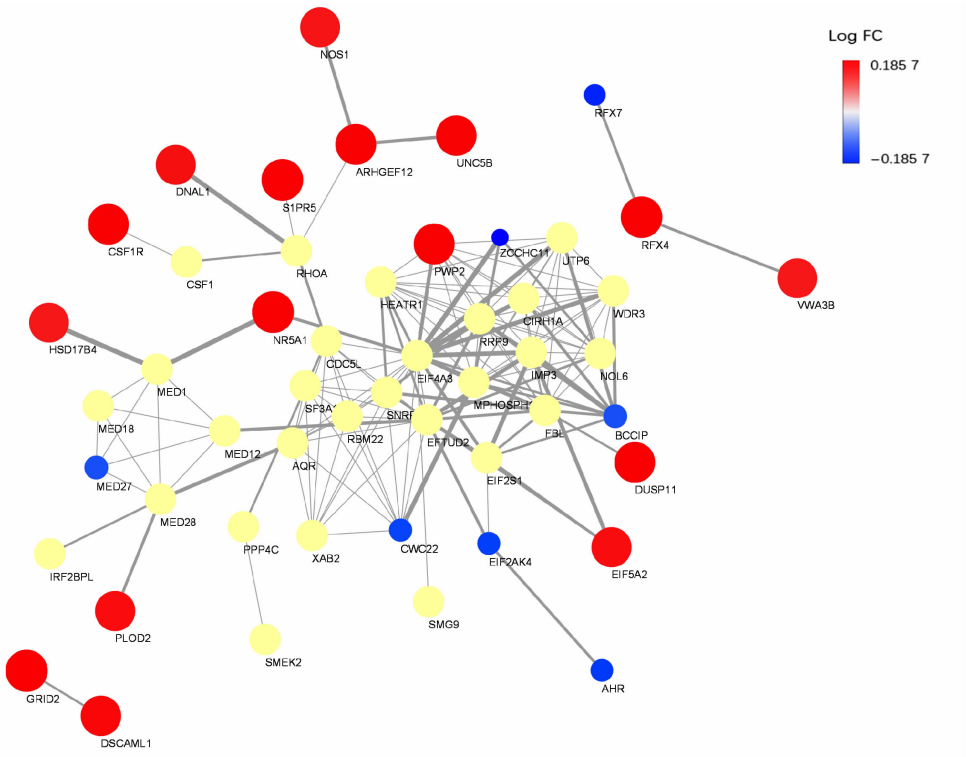
将存在甲基化差异的57个基因采用String在线数据库进行蛋白相互作用网络分析,利用Cytoscape3.8.2软件构建PPI网络(图4)。结果显示:12个差异甲基化基因编码的蛋白质存在直接相互作用,其中甲基化水平升高的为NOS1、ARHGEF12、UNC5B、RFX4、GRID2、DSCAML1、VWA3B、PWP2,甲基化水平降低的为RFX7、ZCCHC11、AHR、EIF2AK4。




气泡的大小表示富集的基因数目;颜色表示富集显著性

A:基因甲基化水平升高;B:基因甲基化水平降低

**图3 甲基化水平升高/降低基因的KEGG富集分析** (前20位)




红色:在抑郁个体中甲基化水平升高的基因表达蛋白;蓝色:在抑郁个体中甲基化水平降低的基因表达蛋白;黄色:在对差异基因表达蛋白进行蛋白质相互作用分析网络时扩展出介导相互作用的蛋白质

**图4 甲基化差异基因的蛋白质相互作用网络**

## 3 讨论

抑郁症的发生与遗传、环境影响密不可分,越来越多的研究者提出用表观遗传学机制来解释环境因素影响基因表达从而参与抑郁的发生。DNA 甲基化作为表观遗传学中最稳定和重要的部分已经被关注。然而,对于环境因素通过表观遗传机制中的 DNA 甲基化影响何种基因从而介导抑郁症的发生仍然存在争议,如 KANG 等[9]在 5-羟色胺转运体(5-HTT)的研究中发现,抑郁症患者 5-HTT 启动子呈显著高甲基化状态,并且甲基化水平与童年的不幸遭遇以及家族抑郁症有关;研究表明糖皮质激素受体基因(nuclear receptor subfamily 3, group C, member1, NR3C1)启动子区甲基化水平与童年期虐待等早期生活事件相关,导致 NR3C1 基因表达改变从而参与抑郁症的发生[10]。

同卵双生子是由一个受精卵分裂发育而来的两个个体,具有相同的基因型。若出现同卵不同抑郁表型双生子现象,基于相同的遗传基础,环境介导基因的表观遗传效应可以在极大程度上解释抑郁的发生,并且有证据显示 DNA 甲基化等表观遗传修饰是导致同卵双生子间出现个体差异的主要原因,表观遗传双生子方法便是利用该原理来协助澄清 DNA 甲基化修饰、基因表达与表型的过程和关系[11]。

本研究在同卵不同抑郁表型双生子中探讨抑郁状态与外周血中 DNA 甲基化的关系。结果显示,与对应的正常对照双生子相比,处于抑郁状态的双生子 DNA 甲基化水平升高的有 45 个基因;DNA 甲基化水平降低的有 12 个基因,且甲基化水平升高或降低的主要区域均处于 Body-opensea。在甲基化水平升高的基因中,CSF1R 编码的集落刺激因子 1 受体是酪氨酸激酶跨膜受体和酪氨酸蛋白激酶 CSF1/PDGF 受体家族的成员,可调控巨噬细胞产生、分化和功能,介导对应集落刺激因子的大部分生物学效应。GAO 等[12]在对重度抑郁症(MDD)的生物信息学分析中就发现 CSF1R 的差异性表达,而 ZHANG 等[13]的研究表明脑-脾轴中 CSF1R 的异常可能在 MDD 的病理生理学过程中起作用。同样,NOS1 基因表达产物属于一氧化氮合酶家族,被认为与焦虑、抑郁等疾病的病理机制有关。研究发现,抑郁患者的前扣带回 NOS1 表达较对照组降低[14]。但另一项人群研究发现抑郁症患者血浆中 NO 水平升高[15],8 周的选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)治疗可以使抑郁症患者的血清 NO 水平显著降低[16]。本研究发现,抑郁状态双生子的 AHR 基因甲基化水平下降。AHR 基因表达产物芳烃受体是一种核受体,可调节对环境刺激的反应。AHR 参与犬尿氨酸(kynurenine, KYN)的生物合成与其路径重要酶的表达调控,从而与抑郁发生相关[17]。FRANCIS 等[18]研究显示,补充 AHR 可能与抑郁症中的炎症调节路径相关。

GO 富集显示分子功能主要富集在大脑中枢神经系统发育以及支持细胞的生长分化等,证明抑郁状态以及抑郁症的发生在一定程度上与中枢神经系统结构功能的改变相关[19]。而细胞组分主要集中在 CSF1-CSF1R 复合体等,分子功能主要集中在巨噬细胞集落刺激因子受体活性、NOS 活性、多核苷酸磷酸酶活性等。在炎症调节与氧化应激等多方面与其他相关抑郁症的研究所契合。KEGG 富集分析显示,甲基化水平升高基因的主要富集通路例如突触长时程抑制(LTD)、PI3K-Akt 信号通路如今也被证明与抑郁发生具有密切关联[20-21]。LTD 指长时程的突触可塑性减弱,即对突触传递的效力与强度的活动依赖调节降低,时间可持续几天、几年甚至终身,与长期记忆的形成和部分认知过程有关[22],而应激和突触可塑性的变化可能也与其他一些信号转导途径有关,例如 NOS-NO、cAMP-PKA、PI3K-Akt 信号通路。PI3K-Akt 信号转导通路是细胞生存的重要通路之一。尸检发现 MDD 自杀患者的腹侧前额叶中 PI3K-Akt 信号通路活性降低[23],大鼠慢性温和不可预知性应激模型(chronic unpredictable mild stress, CUMS)造模的易感性与海马 Akt 信号通路降低有关,抗抑郁药可逆转这一信号通路[24]。在基因表达蛋白质相互作用(PPI)中值得注意的是,虽未筛选出与多个差异甲基化基因具有直接相互作用的关键基因,但 S1PR5、DNAL1、CSF1R、NOS1、ARHGEF12、UNC5B 均与 Ras 同源家族成员 A(Ras homolog family member A, RHOA)存在直接或间接相互作用,表明上述基因可能除在各自不同功能下参与抑郁发生外,还可通过 RHOA 途径调节抑郁的发生、发展。RHOA 蛋白是小 GTP 酶 Rho 家族的一个成员,在信号转导级联中充当分子开关,Rho 蛋白可促进肌动蛋白细胞骨架的重组并调节细胞形状、附着和运动,于人体多组织普遍表达。FOX 等[25]研究表明 RHOA 和 RHO 激酶可通过 NAc D1-MSN 的树突重塑介导抑郁样行为,而在缺氧早期阻断 RHOA/ROCK 通路可提高抗抑郁药物的疗效[26]。因此,即使在我们对外周血 DNA 甲基化的研究中未发现该基因的甲基化修饰改变,但其在蛋白质相互作用中的枢纽地位仍可以佐证本研究是有意义的,即环境因素可以调控多基因的表达改变,从而通过 RHOA 途径参与抑郁症的发生或疾病的部分表现。

本研究结果发现,在外周血中,集落刺激因子 1 受

体(CSF1R)与 NOS1 甲基化水平升高,芳烃受体(AHR)基因甲基化水平降低,KEGG 富集验证了 LTD、PI3K-Akt 信号通路等均与抑郁发生有关联。此外,在蛋白质相互作用中发现 RHOA 或许是多个基因参与抑郁发生的共同中介,可能在抑郁发生、发展以及治疗中发挥重要作用。

本研究纳入 3 对同卵双生子作为研究对象,相同基因型而不同表型可作为甲基化研究的理想研究对象,因此本研究结果具有一定的参考价值。而在以后的研究中我们拟扩大样本量,在患病人群与正常对照组中选取重点甲基化位点进行定性、定量分析以及下游表达产物的分析以求获得更为准确的差异基因结果。然而抑郁的发生主要为脑神经功能紊乱,鉴于青少年脑组织的获取具有一定难度,本研究主要以外周血作为样本进行 DNA 甲基化研究。WALTON 等[27]对精神分裂症的研究结果表明血液和脑组织之间存在统计学上显著相关性的甲基化位点。从参与维持 DNA 甲基化的甲基转移酶(DNA methyltransferase enzymes, DNMTs)角度来看,有研究发现抑郁症发作期患者外周血 DNMT1 mRNA 水平降低[28],抑郁症患者的尸检结果同样显示 DNMT1 mRNA 在前额叶和杏仁核中的表达水平降低[29]。尽管本研究中发现的差异甲基化基因可在外周血水平反映疾病发生的真实状态,但仍需在动物实验中获取脑组织与外周血进行进一步验证。在抑郁相关研究中,有研究表明抑郁程度与甲基化水平存在相关性[30]。由于本研究样本量较少,无法对抑郁程度与甲基化水平进行分层比较,需在验证时扩大样本进行进一步分析。

**参考文献:**


[1] FRIEDRICH M J. Depression is the leading cause of disability around the world[J]. JAMA, 2017, 317(15): 1517. DOI: 10.1001/jama.2017.3826.

[2] WANG J, HODES G E, ZHANG H, *et al*. Epigenetic modulation of inflammation and synaptic plasticity promotes resilience against stress inmice[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 477. DOI: 10.1038/s41467-017-02794-5.

[3] COLEMAN J R I, GASPAR H A, BRYOIS J. The genetics of the mood disorder spectrum: Genome-wide association analyses of more than 185, 000 cases and 439, 000 controls[J]. Biol Psychiatry, 2020, 88(2): 169-184. DOI: 10.1016/j.biopsych.2019.10.015.

[4] WEDER N, ZHANG H P, JENSEN K, *et al*. Child abuse, depression, and methylation in genes involved with stress, neural plasticity, and brain circuitry[J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2014, 53(4): 417-424.e5. DOI: 10.1016/j.jaac.2013.12.025.

[5] BARANZINI S E, MUDGE J, VAN VELKINBURGH J C, *et al*. Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis[J]. Nature, 2010, 464(7293): 1351-1356. DOI: 10.1038/nature08990.

[6] CASTELLANI C A, LAUFER B I, MELKA M G, *et al*. DNA methylation differences in monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia identifies psychosis related genes and networks[J]. BMC Med Genomics, 2015, 8: 17. DOI: 10.1186/s12920-015-0093-1.

[7] 邹志礼, 黄雨兰, 汪瑾宇, 等. 脑源性神经营养因子基因启动区 DNA 甲基化与惊恐障碍的关联研究[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2020, 29(9): 792-796. DOI: 10.3760/cma.j.cn371468-20200415-01256.
ZOU Z L, HAUNG Y L, WANG J Y, *et al*. Association study of the BDNF promoter methylation status with panic disorder[J]. Chin J Behav Med Brain Sci, 2020, 29(9): 792-796. DOI: 10.3760/cma.j.cn371468-20200415-01256.

[8] 章晨晨, 凌宇, 肖晶, 等. 中文版长处和困难量表(自评版)在 832 例青少年中的试用[J]. 中国临床心理学杂志, 2009, 17(1): 8-11.
ZHANG C C, LING Y, XIAO J, *et al*. Application of Chinese version of the self-report strengths and difficulties questionnair in a sample of 832 adolescents[J]. Chin J Clin Psychol, 2009, 17(1): 8-11.

[9] KANG H J, KIM J M, STEWART R, *et al*. Association of SLC6A4 methylation with early adversity, characteristics and outcomes in depression[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2013, 44: 23-28. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2013.01.006.

[10] KELLER S, SARCHIAPONE M, ZARRILLI F, *et al*. Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicidesubjects[J]. Arch Gen Psychiatry, 2010, 67(3): 258-267. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2010.9.

[11] PALMA-GUDIEL H, CÓRDOVA-PALOMERA A, NAVARRO V, *et al*. Twin study designs as a tool to identify new candidate genes for depression: a systematic review of DNA methylation studies[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2020, 112: 345-352. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2020.02.017.

[12] GAO Y, ZHAO H, XU T, *et al*. Identification of crucial genes and diagnostic value analysis in major depressive disorder using bioinformatics analysis[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2020. [Online ahead of print]. DOI: 10.2174/1386207323999201124204413.

[13] ZHANG J C, CHANG L J, PU Y Y, *et al*. Abnormal expression of colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) and transcription factor PU.1 ($SPI_1$) in the spleen from patients with major psychiatric disorders: a role of brain-spleen axis[J]. J Affect Disord, 2020, 272: 110-115.

DOI: 10.1016/j.jad.2020.03.128.

[14] HASHIOKA S, KLEGERIS A, MONJI A, *et al*. Antidepressants inhibit interferon-gamma-induced microglial production of IL-6 and nitricoxide[J]. Exp Neurol, 2007, 206(1): 33-42. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.03.022.

[15] GAO S F, QI X R, ZHAO J, *et al*. Decreased $NOS_1$ expression in the anterior cingulate cortex in depression[J]. Cereb Cortex, 2013, 23(12): 2956-2964. DOI: 10.1093/cercor/bhs285.

[16] WANG D, AN S C, ZHANG X. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxideinhibitor[J]. Neurosci Lett, 2008, 433(1): 59-64. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.12.041.

[17] LIU D, RAY B, NEAVIN D R, *et al*. Beta-defensin 1, aryl hydrocarbon receptor and plasma kynurenine in major depressive disorder: metabolomics-informed genomics [J]. Transl Psychiatry, 2018, 8(1): 10. DOI: 10.1038/s41398-017-0056-8.

[18] FRANCIS T C, GAYNOR A, CHANDRA R, *et al*. The selective RhoA inhibitor rhosin promotes stress resiliency through enhancing D1-medium spiny neuron plasticity and reducing hyperexcitability[J]. Biol Psychiatry, 2019, 85(12): 1001-1010. DOI: 10.1016/j.biopsych.2019.02.007.

[19] GRAY J P, MÜLLER V I, EICKHOFF S B, *et al*. Multimodal abnormalities of brain structure and function in major depressive disorder: a meta-analysis of neuroimaging studies [J]. Am J Psychiatry, 2020, 177(5): 422-434. DOI: 10.1176/appi.ajp.2019.19050560.

[20] ÄMMÄLÄ A J, URRILA A S, LAHTINEN A, *et al*. Epigeneticdysregulation of genes related to synaptic long-term depression among adolescents with depressive disorder and sleep symptoms[J]. Sleep Med, 2019, 61: 95-103. DOI: 10.1016/j.sleep.2019.01.050.

[21] WU Z T, WANG G H, WEI Y Y, *et al*. PI3K/AKT/GSK3β/CRMP-2-mediated neuroplasticity in depression induced by stress[J]. Neuroreport, 2018, 29(15): 1256-1263. DOI: 10.1097/WNR.0000000000001096.

[22] PINAR C, FONTAINE C J, TRIVIÑO-PAREDES J, *et al*. Revisiting the flip side: Long-term depression of synaptic efficacy in the hippocampus[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2017, 80: 394-413. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2017.06.001.

[23] KAREGE F, PERROUD N, BURKHARDT S, *et al*. Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3beta in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims[J]. Biol Psychiatry, 2007, 61(2): 240-245. DOI: 10.1016/j.biopsych.2006.04.036.

[24] BRIONES A, GAGNO S, MARTISOVA E, *et al*. Stress-induced anhedonia is associated with an increase in Alzheimer's disease-related markers[J]. Br J Pharmacol, 2012, 165(4): 897-907. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01602.x.

[25] FOX M E, CHANDRA R, MENKEN M S, *et al*. Dendritic remodeling of D1 neurons by RhoA/Rho-kinase mediates depression-like behavior[J]. Mol Psychiatry, 2020, 25(5): 1022-1034. DOI: 10.1038/s41380-018-0211-5.

[26] LI B C, XU Y, QUAN Y, *et al*. Inhibition of RhoA/ROCK pathway in the early stage of hypoxia ameliorates depression in mice *via* protecting myelin sheath[J]. ACS Chem Neurosci, 2020, 11(17): 2705-2716. DOI: 10.1021/acschemneuro.0c00352.

[27] WALTON E, HASS J, LIU J, *et al*. Correspondence of DNA methylation between blood and brain tissue and its application to schizophrenia research[J]. Schizophr Bull, 2016, 42(2): 406-414. DOI: 10.1093/schbul/sbv074.

[28] HIGUCHI F, UCHIDA S, YAMAGATA H, *et al*. State-dependent changes in the expression of DNA methyltransferases in mood disorder patients[J]. J Psychiatr Res, 2011, 45(10): 1295-1300. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2011.04.008.

[29] POULTER M O, DU L, WEAVER I C, *et al*. GABAA receptor promoterhypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes[J]. Biol Psychiatry, 2008, 64(8): 645-652. DOI: 10.1016/j.biopsych.2008.05.028.

[30] ZHAO J Y, GOLDBERG J, BREMNER J D, *et al*. Association between promoter methylation of serotonin transporter gene and depressive symptoms: a monozygotic twin study [J]. Psychosom Med, 2013, 75(6): 523-529. DOI: 10.1097/PSY.0b013e3182924cf4.

(收稿:2021-09-09;修回:2021-10-10)

(编辑 吴培红)