

# DEEP SEQ方法检测新生儿毛干 蛋白质组动态变化

胡宇虹<sup>1#</sup>, 俞相明<sup>1#</sup>, 宋丽丽<sup>2</sup>, 邢清和<sup>1</sup>, 周峰<sup>1</sup>

(1. 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032; 2. 复旦大学附属妇产科医院新生儿科, 上海 200090)

**摘要** 利用一种深度高效肽段鉴定蛋白质组学方法, 结合相对定量同位素标记, 对新生儿出生后 24, 48, 72 和 96 h 的自然掉落毛干样本中的蛋白质进行差异蛋白质组分析. 在新生儿出生后 96 h 内采集的 4 份毛干样本中, 共鉴定到 1735 个蛋白, 有大量蛋白表达量表现出动态变化, 涉及胚胎发育、能量代谢及神经系统相关通路. 结果表明, 毛干作为新颖的临床样本, 能够反映新生儿早期剧烈的生理和分子变化过程, 为新生儿的无创诊断和早期疾病筛查提供了新的思路.

**关键词** 新生儿毛干; 新生儿筛查; 蛋白质组学; 质谱

中图分类号 O657 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20240326

## Dynamic Proteome Profiling of Neonatal Hair Shaft Using DEEP SEQ Method

HU Yuhong<sup>1#</sup>, YU Xiangming<sup>1#</sup>, SONG Lili<sup>2</sup>, XING Qinghe<sup>1</sup>, ZHOU Feng<sup>1\*</sup>

(1. Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China;

2. Department of Neonatology, Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai 200090, China)

**Abstract** This article utilizes the deep efficient peptide sequencing and quantification proteomics method in conjunction with isobaric tags for relative and absolute quantitation to perform differential proteomic analysis of proteins in naturally shed hair samples collected at 24, 48, 72 and 96 h after birth in newborns. Among the four hair samples collected within 96 h after birth, a total of 1735 proteins were identified, with a large number of proteins showing dynamic changes in expression, involving embryonic development, energy metabolism, and neural pathways. These findings indicate that hair samples, as a novel clinical specimen, can reflect the early and drastic physiological and molecular changes in newborns, providing new insights for non-invasive diagnosis and early disease screening in newborns.

**Keywords** Neonatal hair shaft; Newborn screening; Proteomics; Mass spectrometry

新生儿的早期生命阶段, 体内的生理和代谢系统经历了一连串复杂而剧烈的变化, 包括体温调节、肺部扩张、肾脏滤过功能的成熟、神经系统发育等转变. 新生儿早期疾病筛查能够对一些先天性、遗传性疾病进行筛检, 在患儿尚未出现临床疾病表现而其体内生化、代谢或功能已有变化时就做出早期诊断. 目前, 常规新生儿筛查通常需采集新生儿干血片、血液样本, 对采样者有一定的技术要求, 并

收稿日期: 2024-07-01. 网络首发日期: 2024-08-13.

联系人简介: 周峰, 男, 博士, 教授, 主要从事疾病蛋白质组学方面的研究. E-mail: zhou\_feng@fudan.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 32171432)和国家重点研发计划项目(批准号: 2022YFC3400202)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.32171432) and the National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFC3400202).

# 共同第一作者.

且有创的采样方法可能会造成包括皮下瘀斑、局部血肿、针眼出血感染等不良影响。研究表明, 新生儿诊断性采血可能导致大量内源性失血, 进而增加新生儿支气管肺发育不良的发生率<sup>[1]</sup>。特别是在新生儿重症监护病房(NICU), 极低出生体质量儿(VLBW)每周实验室检查失血量为11~22 mL/kg, 相当于有效循环血容量的15%~30%<sup>[2]</sup>。此外, 每20例VLBW患儿中约有25%的实验室采血量超出疾病诊疗常规的需要<sup>[3]</sup>。因此, 开发无创的新生儿诊断程序具有重大意义, 可以避免因采血而导致的新生儿不良反应。

新生儿的毛干因为其无创、稳健性、易于采样、样本量丰富和处理简便等特点, 为临床样本的选择提供了一个新颖而具有潜力的维度。皮质醇等与人体代谢调节相关的激素已被证明能够在毛干中被检测到<sup>[4]</sup>, 表明相关分子可能通过毛囊附近的毛细血管进入毛囊中的生长细胞, 进而进入毛干, 或在毛干形成过程中从皮肤深层区室中掺入毛干中<sup>[5]</sup>。

本文分别采集了新生儿出生后24 h PN, 48 h PN, 72 h PN, 96 h PN(PN, postnatal)内自然掉落的头发毛干, 利用我们开发的深度高效肽段鉴定及定量(DEEP SEQ)方法<sup>[6]</sup>结合相对定量同位素标记法(iTRAQ), 进行蛋白质组学数据挖掘, 通过分析动态变化的蛋白质表达谱, 更好地理解早期新生儿体内的生理与分子变化, 进而开发出新的诊断工具和策略。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

甲酸(FA, 质谱纯)、0.5 mol/L三(2-羧乙基)膦还原剂(TCEP, 纯度 $\geq$ 98%)、甲基硫甲磺酸酯(MMTS, 纯度 $\geq$ 98%)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液干粉包和胰蛋白酶(纯度 $\geq$ 95%), 美国Thermo Fisher公司; 尿素(Urea, 分析纯)、十二烷基硫酸钠(SDS, 纯度 $\geq$ 99.0%)、氯化钾(KCl, 分析纯)和碳酸氢铵(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 乙腈(ACN, 质谱纯)、乙醇(ETOH, 质谱纯)、丙酮(ACE, 质谱纯)和1 mol/L三乙基碳酸氢铵缓冲溶液, 德国Merck公司; Pierce™ BCA蛋白检测试剂盒-还原剂兼容, 美国Thermo Fisher公司; iTRAQ® Reagents-4plex Applications Kit-Protein同位素标记试剂盒, 美国AB Sciex公司。

NanoAcquity UHPLC System超高效液相色谱仪(德国Waters公司); Centrifuge 5810R超速冷冻离心机(德国Eppendorf公司); 5600 Triple TOF高分辨质谱仪(MS, 美国AB Sciex公司)。

### 1.2 实验过程

1.2.1 新生儿毛干样本的获取 所用的毛干样本来自健康新生儿。样本分别于新生儿出生后的24, 48, 72和96 h采集。每次采集时, 收集5根新生儿自然脱落的毛发, 除去毛囊, 仅保留毛干部分。所采集的样本分别编号为24 h PN, 48 h PN, 72 h PN和96 h PN, 保存于密封袋中并做好标记, 于4 °C下储存。

1.2.2 新生儿毛干蛋白质的提取、酶解及iTRAQ标记 向每管新生儿毛发样品中加入500  $\mu$ L 0.2% SDS in Tris(质量/体积)以及3粒直径为3 mm的不锈钢研磨珠, 在60 Hz下对管中的毛发研磨60 min后, 将离心管置于37 kHz超声水浴中处理60 min, 将头发基质分散、裂解, 以达到更充分地提取蛋白的目的。将所得产物于低温(20 °C)下以12000 r/min转速离心30 min。取300  $\mu$ L上层清液至新离心管中, 参照文献[6]方法, 加入1800  $\mu$ L冷丙酮沉淀蛋白, 然后使用含8 mol/L尿素和0.1 mol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>的溶液溶解蛋白沉淀。对溶解后的澄清溶液, 使用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。根据BCA所测浓度, 每个样品取100  $\mu$ g蛋白溶液, 进行后续的酶切。加入10  $\mu$ L 0.5 mol/L TCEP, 于37 °C下孵育1 h进行还原反应; 加入2  $\mu$ L MMTS, 在37 °C下孵育1 h进行烷基化反应。按胰蛋白酶与蛋白质量比1:25加入胰蛋白酶, 于37 °C反应12 h。从低温冰箱里取出4-plex iTRAQ试剂, 在室温下平衡10 min后溶解于乙醇中; 将肽段重悬于500 mmol/L三乙基碳酸氢铵缓冲液中, 与相应的iTRAQ试剂混合, 在室温下孵育1 h。将24 h PN, 48 h PN, 72 h PN和96 h PN的样品分别用iTRAQ 114, iTRAQ 115, iTRAQ 116和iTRAQ 117标记。随后, 使用旋转蒸发器在30 °C下进行真空离心以达到干燥, 用50  $\mu$ L 2.5% ACN溶解

肽段. 溶解后的肽段转移至上样瓶中, 以备后续分析.

**1.2.3 样品的多维分析** 使用DEEP SEQ方法<sup>[6]</sup>对肽段样品进行多维分离. 所使用的仪器是改造后的NanoAcquity UHPLC System超高效液相色谱仪. 在分离过程中, 自动取样器以2 mL/min的流速从进样环提取肽段样品以及第一、第二维度洗脱液, 将样品输送到后续部分. 每次注入第一或第二维度的洗脱物构成一个“DEEP SEQ馏分”. 二元泵以8 mL/min的流速注入0.1% (体积分数) FA, 用于稀释有机物并使第一/第二维度的流出液在第三维度预柱之前酸化; 或以5 nL/min的流速为从第三维度反相(RP)柱上洗脱肽段提供梯度(洗脱液A: 0.1% FA; 洗脱液B: 含0.1% FA的ACN溶液, 浓度范围2%~50%, 洗脱时间580 min).

第一维RP柱的总装载容量约为100 μg肽样品. 第一维和第二维洗脱液中的乙腈浓度为7%~55%, KCl浓度为10~300 mmol/L. 上述条件在生物输入方面具有鲁棒性, 因此每个样品无需进行技术重复. 在本次实验中, 深度为20个馏分的DEEP SEQ实验总共需8 d进行数据收集. 所有数据均使用单个直径为25 μm×100 cm的分析柱获得.

**1.2.4 质谱分析** 5600 Triple TOF质谱仪在数据依赖采集模式下运行, 对酶切肽段进行检测分析. 在每个质谱扫描中选择前50个前体离子(电荷态+2~+5)进行MS/MS分析(扫描范围350~1500 *m/z*), 最小驻留时间为140 ms, 扫描范围为100~1400 *m/z*. 应用了20 s的动态排除窗口, 并以单位分辨率解析前体离子. 电喷雾电压设置为2.2 kV.

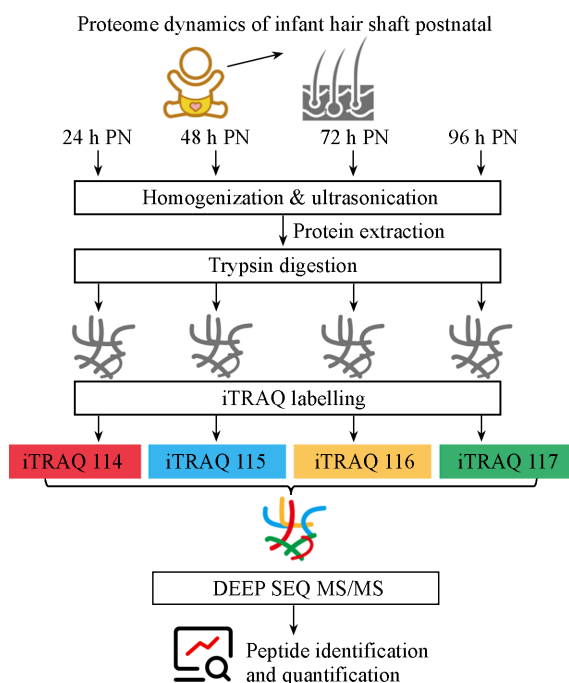
**1.2.5 数据库检索** 使用软件Protein Pilot V4.4对从5600 Triple TOF质谱仪获得的数据进行MS/MS数据搜索, 具体参数如下: 对于半胱氨酸的固定修饰值设置为+42, 样品类型指定为“iTRAQ 4-plex”(肽标记). 基于蛋白假阳性率(FDR)对肽段进行过滤, 仅考虑那些得分达到或超过倾向得分匹配FDR阈值1%的肽段. 依据Qeli和Ahrens的方法, 将通过FDR筛选的肽段进行分类<sup>[7]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 实验方法

利用DEEP SEQ分析方法<sup>[6]</sup>, 结合iTRAQ(4-plex)标记法, 对一名健康新生儿的毛干样本进行蛋白质组学研究. 分别于健康新生儿出生后的24, 48, 72和96 h, 采集其自然脱落的毛干样本, 通过低温研磨、超声处理对新生儿毛干蛋白进行提取, 对提取所得蛋白进行还原、烷基化后使用胰蛋白酶酶切. 将酶切所得24 h PN, 48 hPN, 72 h PN和96 h PN的肽段分别用iTRAQ 114, iTRAQ 115, iTRAQ 116和iTRAQ 117试剂标记, 混合后用2.5% ACN复溶, 以进行后续的组学分析(Scheme 1).

所用的DEEP SEQ多维分离方法能够对样品进行三维肽分离. 该方法在改造后的NanoAcquity UHPLC System超高效液相色谱仪上进行. 改装的UHPLC系统配备有一个二元泵、一个等浓度泵和一个自动取样器, 以及一个额外的六口二位阀门. 该系统由第一维RP柱、第二维阴离子交换柱、第三维RP预处理柱和分析柱组成, 对输入的肽段样本进行三维分离. 经分离后的肽段在5600 Triple TOF高分辨质谱仪上于数据依赖采集模式下进行质谱分析. 对于质谱分析所得数据, 使用软件Protein Pilot (V4.4)进行MS/MS数据搜索. 使用Python和R语言对搜库后数据进行生物信息学处理.



**Scheme 1** Proteome profiling of infant hair shaft postnatal utilizing DEEP SEQ method

## 2.2 新生儿出生96 h内毛干蛋白鉴定结果及蛋白差异表达分析

通过DEEP SEQ方法,在新生儿出生后96 h内的毛干中鉴定到1735个蛋白质,其中,包括24种高表达的角蛋白.对新生儿24 h PN, 48 h PN, 72 h PN和96 h PN的4个样本进行差异蛋白质组分析,其毛发蛋白质组表现出剧烈的变化,动态范围跨越了6个数量级[图1(A)].根据后三天分别相较于第一天的表达变化大于1.5倍以及 $P < 0.05$ 进行筛选,48 h PN相较于24 h PN,有90个蛋白出现显著上调,97个蛋白出现显著下调[图1(B)];72 h PN相较于24 h PN,有72个蛋白出现显著上调,163个蛋白出现显著下调[图1(C)];96 h PN相较于24 h PN,有59个蛋白出现显著上调,142个蛋白出现显著下调[图1(D)].

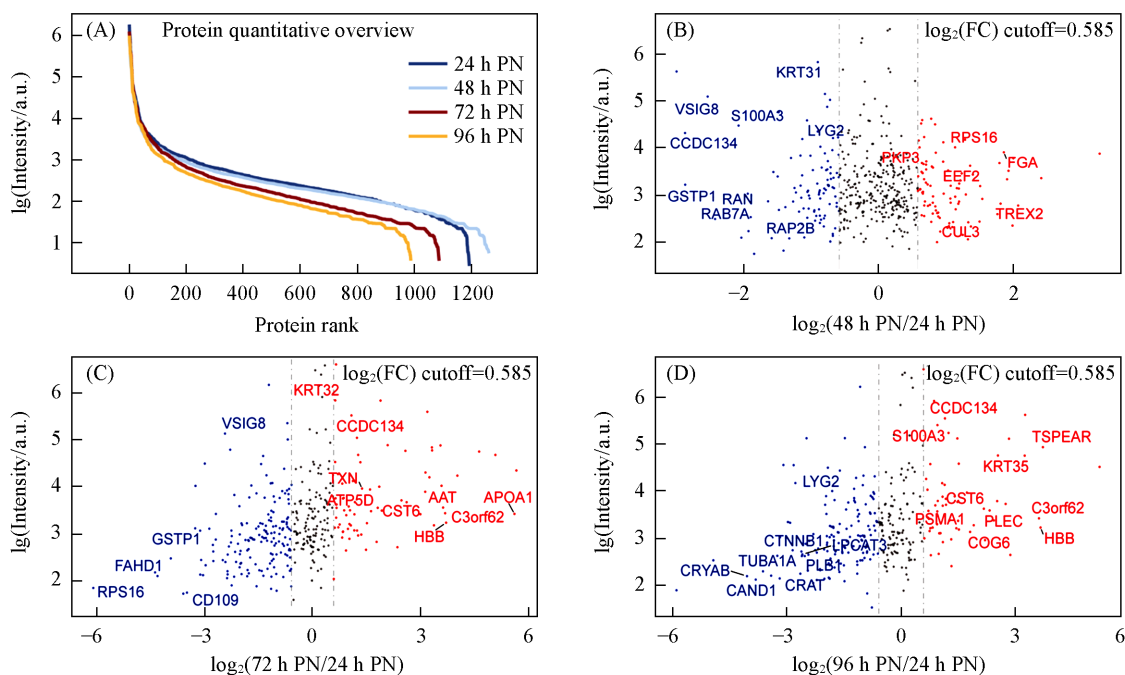


Fig. 1 Proteins identified in 24 h PN, 48 h PN, 72 h PN, 96 h PN ranked according to their MS signals respectively(A), volcano map of differentially expressed proteins between 24 h PN and 48 h PN(B), 24 h PN and 72 h PN(C), 24 h PN and 96 h PN(D)

对24 h PN, 48 h PN, 72 h PN和96 h PN 4个样本进行差异蛋白质组分析发现,编码人血红蛋白珠蛋白 $\beta$ 亚基的HBB蛋白在72 h PN, 96 h PN的样本中相较于24 h PN表达均出现显著上调.人血红蛋白四聚体在胚胎时期主要由 $\alpha$ -珠蛋白和 $\gamma$ -珠蛋白组成;随着胎儿出生后的生长发育,四聚体中的 $\gamma$ -珠蛋白逐渐被 $\beta$ -珠蛋白取代.在新生儿毛干中观察到HBB表达量的上升极有可能是上述珠蛋白转换过程的一种反映. CCDC134是卷曲螺旋结构域蛋白家族中的一员,其表达量在第二天降低,在72 h PN和96 h PN中急剧升高.研究发现,CCDC134被发现在胚胎发育中发挥关键作用,敲除小鼠神经干细胞中的CCDC134基因后,会导致小鼠小脑皮质细胞数量减少、小脑皮质细胞树突生长受损、粒细胞发育异常,还会导致小鼠出现运动协调和运动学习缺陷<sup>[8]</sup>.

类似的, CST6, C3orf62, COG6在后两天的表达量也均显著高于前两天.相反,也有不少水解代谢和催化作用相关的蛋白(如NDUFV2, FAHD1, LYG2)的表达量在发育过程中逐步下降.尽管LYG2的蛋白表达量在下降,但相较于其它蛋白,该蛋白表达量仍维持在一个很高的水平.

由上述结果可知,新生儿毛干蛋白能够反映在生命初期新生儿体内发生的一系列生长发育动态过程,同时,毛干中存在与新生儿生理状态密切相关的蛋白,这可能为日后检测新生儿的整体健康状态提供重要的观察窗口.

## 2.3 新生儿毛发蛋白的层次聚类分析

采用无监督层次聚类算法对新生儿毛干蛋白进行聚类分析,并以热图形式呈现(图2).由图2(A)

可见,在新生儿出生后的96 h内,其毛干蛋白质组发生剧烈的变化.对新生儿出生后96 h内的毛干蛋白的变化趋势进行分析[图2(B)],发现有16.6%的蛋白表达呈上升-下降-下降的趋势;12.1%的蛋白表达呈下降-上升-下降的趋势.

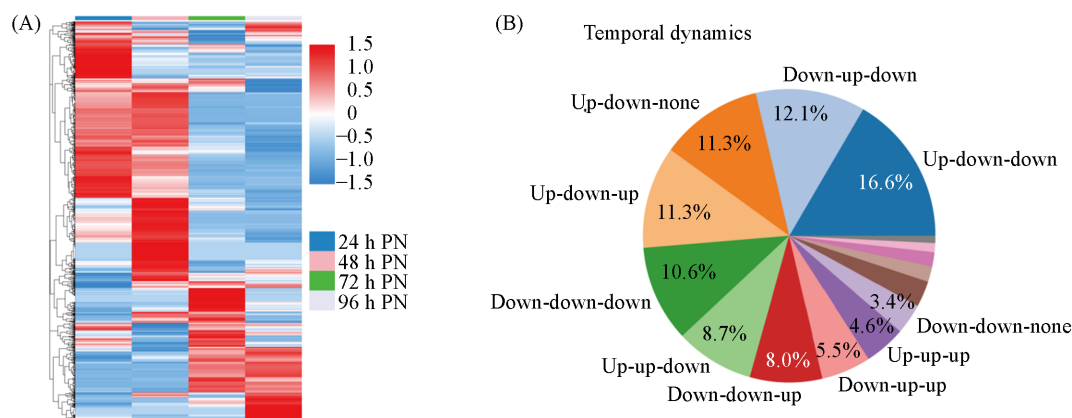


Fig. 2 Hierarchical cluster analysis of proteins in infant hair shaft postnatal(A) and pie chart of proportion of proteins with different expression trend(B)

#### 2.4 新生儿毛发蛋白的GO富集分析和京都基因与基因组百科全书分析

对新生儿出生后96 h内的毛发样本中鉴定所得的1735个蛋白进行GO分析,图3(A)为依据 $P < 0.05$ 将细胞功能(GO-MF)、生物学过程(GO-BP)和细胞组分(GO-CC)中的显著富集通路进行展示. GO-MF分析显示,新生儿毛发蛋白主要涉及的分子功能包括蛋白结合、氧化还原酶活性、水解酶活性、细胞骨架结构成分、电子转移活性、乙酰辅酶AC-酰基转移酶活性、抗氧化活性以及核仁小RNA结合等. GO-BP分析显示,新生儿毛发蛋白主要涉及的生物过程包括细胞器组织、分解代谢过程、细胞内转运、前体代谢产物和能量的产生、酰胺代谢过程、对压力的反应、发展过程等. GO-CC分析显示,新生儿毛发蛋白主要定位于胞外分泌体、线粒体、蛋白酶体复合体、角化信封、催化步骤2剪接体等细胞成分中.

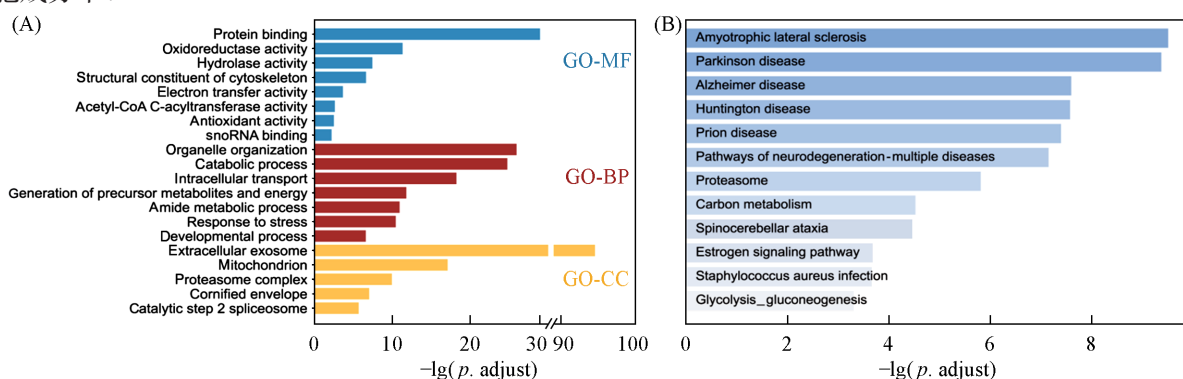


Fig. 3 Gene ontology(GO) analysis(A) and KEGG pathway analysis(B) of proteins in infant hair shaft postnatal

同时对鉴定到的蛋白进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析[图3(B)],KEGG分析富集所得通路主要包括肌萎缩侧索硬化症(ALS)、帕金森病、阿尔茨海默症、亨廷顿病、朊病毒病、神经退行性变的途径——多种疾病、蛋白酶体、碳代谢、脊髓小脑共济失调、雌激素信号通路、金黄色葡萄球菌感染、糖酵解/糖异生等信号通路.

GO分析结果显示,新生儿毛干蛋白中有大量与氧化还原调节过程相关的蛋白.氧化还原调节信号在细胞信号转导中起关键作用,酶促反应产生的活性氧等物质作为第二信使,在调节蛋白质的翻译后修饰、生化途径和细胞功能之中起重要作用.氧化还原分子、氧化还原调节途径和不同脑区功能的鉴定和表征也揭示了中枢神经系统中氧化应激和神经变性的起源.已有研究表明,氧化还原变化发生

在神经退行性疾病的早期阶段,如肌萎缩侧索硬化症、阿尔茨海默症、亨廷顿舞蹈症和帕金森病<sup>[9]</sup>。

KEGG 通路富集分析结果显示,在新生儿毛干中包含大量与神经退行性疾病发生相关的蛋白(如 VDAC1 和 CTNNB1 等)。这类蛋白的调控失调可能是导致神经疾病的重要因素。如,VDAC1 与 APP、A $\beta$  和磷酸化 tau 蛋白之间存在的相互作用可能导致线粒体孔道堵塞,进而引发线粒体功能紊乱,最终导致帕金森病的发生<sup>[10]</sup>;CTNNB1 的常染色体显性种系失活突变与渗出性玻璃体视网膜病变和伴有痉挛双瘫和视觉缺陷的神经发育障碍有关<sup>[11]</sup>。尽管一部分神经类疾病的临床症状大多在中老年后显现,但细胞水平上的相关变化可能在生命早期就已经开始。

在新生儿毛干蛋白中还包括不少神经系统特异性表达的蛋白,如 SHC3, CHRNA6, GABRR3 和 CACNA2D2 等,这些蛋白在新生儿出生后 96 h 内的毛干样本中发生剧烈动态变化。SHC3 所编码的 SHC3 蛋白通常在成熟神经元中表达,是一种能够将激活的生长因子受体与神经元信号转导途径相连接的信号适配器。该蛋白在 48 h PN 和 72 h PN 表达相当且相较于 24 h PN 升高,同时在 KEGG 中雌激素信号通路中被富集到。SHC3 与细胞存活和分化有关,其下调可导致缺氧信号、细胞凋亡和炎症反应异常改变<sup>[12]</sup>。SHC3 基因的单核苷酸多态性可能是精神分裂症风险提升的危险因素之一<sup>[13]</sup>。SHC3 蛋白被发现在脑损伤中具有功能性神经保护作用,可能对中风的治疗有影响。CHRNA6 是烟碱型乙酰胆碱受体家族的一种蛋白,仅在 96h PN 被检测到,其可介导多巴胺神经传递,并被乙酰胆碱和外源性尼古丁激活。研究表明,CHRNA6 基因的单核苷酸多态性与一种慢性、高复发性、成瘾性精神类疾病尼古丁依赖症具有高度相关性<sup>[14]</sup>。

GO 分析与 KEGG 分析结果进一步提示,在新生儿毛干中存在与神经系统特异性相关的蛋白,并且能够观察到动态变化。通常,神经系统疾病的诊断需通过有创方法取脑脊液样本或血液样本,而这一结果提供了一个可能存在的神经系统疾病无创检测窗口。神经系统疾病的潜伏期可能长达数年甚至数十年,而本文的研究结果表明,一些与神经系统疾病高度相关的蛋白在新生儿阶段即可在毛干中被检测到,这提示我们可能通过毛干样本尽早进行诊断,而后采取合理的干预措施。

## 2.5 新生儿毛发蛋白的蛋白质相互作用网络分析

通过蛋白质相互作用(PPI)网络对新生儿毛发蛋白的相互关系进行研究,氧化磷酸化和电子转移活性模块以及碳代谢模块是其最为核心的两个模块[图 4(A)和(B)]。在氧化磷酸化和电子转移活性模块中,COX5A, COX7C, ATP5PF 等 25 个蛋白位于功能网络节点;在碳代谢模块中, GPI, PKM, PGK1 等 22 个蛋白位于功能网络节点。糖代谢属于碳代谢中的一部分,是脑组织供能最重要的生化过程之一。人体细胞的能量通常来源于葡萄糖,葡萄糖经糖酵解反应后生成丙酮酸,在血氧正常的情况下,细胞将使用进入线粒体的丙酮酸通过三羧酸循环生成 ATP 来供能,然而,低氧状态下,在癌细胞或其它高度增殖的细胞类型中,丙酮酸会在乳酸脱氢酶的作用下生成乳酸,这一过程被称作“Warburg 效应”。近年来,一些研究发现 Warburg 效应存在于神经系统细胞中<sup>[15]</sup>。Warburg 效应是出生后脑神经早期发育的主要代谢途径,参与轴突伸长、突触发生和髓鞘化过程<sup>[16]</sup>。Warburg 效应可以通过改善代谢及

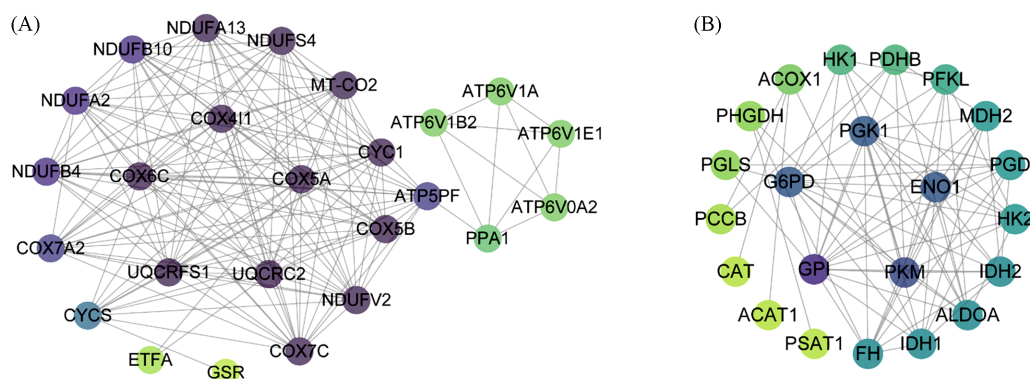


Fig. 4 Protein-protein interaction(PPI) analysis of oxidative phosphorylation and electron transfer activity(A) and carbon metabolism(B)

氧化应激延长脑部寿命<sup>[17]</sup>。当 Warburg 效应出现异常时,可能导致神经系统疾病的发生。已有研究表明,在 ALS 患者及 ALS 老鼠模型中,Warburg 效应关键酶丙酮酸脱氢酶激酶(Pdk)、乳酸脱氢酶 A(LDHA)的表达出现明显增加,导致 Warburg 效应明显上调,使得氧化磷酸化过程受到抑制<sup>[18]</sup>。上述证据表明,在新生儿毛干中,能够检测到大量与碳代谢、氧化还原作用相关的蛋白质,当碳代谢、氧化还原作用出现异常时,可能对新生儿的神经系统发育造成影响,因此,毛干中的这类蛋白质里可能包含可指示神经系统相关疾病早期发生发展情况的生物标志物,这无疑为神经系统疾病的早期无创诊断提供了新的思路。

### 3 结 论

采用 DEEP SEQ 方法结合 iTRAQ 法对新生儿出生后 24, 48, 72 和 96 h 的毛干样本进行了蛋白质组学分析。在新生儿毛干中共鉴定到 1735 个蛋白质,同时观察到,在 24 h PN, 48 h PN, 72 h PN, 96 h PN 的新生儿毛干样本中出现了显著的蛋白差异表达。研究结果表明,新生儿出生后的旺盛发育代谢过程能够在毛发中得到反映。对鉴定所得新生儿毛干蛋白质进行 GO 富集以及 KEGG 分析、PPI 网络分析后发现,新生儿毛干蛋白显著富集于与能量代谢、神经系统疾病相关的通路和模块中。上述结果提示毛干是未来一个可能存在的新生儿无创筛查样本,且有可能在新生儿期间对一些疾病(如神经系统疾病)在发生发展的极早期进行诊断,为后续潜在疾病的及时干预提供线索和指导。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Shi Y. Y., *Int. J. Pediatr.*, **2020**, 47(4), 293(石永言. 国际儿科学杂志, **2020**, 47(4), 293)
- [ 2 ] Widness J. A., *NeoReviews*, **2008**, 9(11), e520—e525
- [ 3 ] Carroll P. D., Widness J. A., *Semin Perinatol*, **2012**, 36(4), 232—243
- [ 4 ] Evans B. E., Beijers R., Hagquist C., de Weerth C., *Psychoneuroendocrinology*, **2019**, 102, 53—57
- [ 5 ] Gao W., Penz M., Wekenborg M., Walther A., Kirschbaum C., *Psychoneuroendocrinology*, **2019**, 106, 129—137
- [ 6 ] Zhou F., Lu Y., Ficarro S. B., Adelmant G., Jiang W., Luckey C. J., Marto J. A., *Nat. Commun.*, **2013**, 4(1), 2171
- [ 7 ] Qeli E., Ahrens C. H., *Nat. Biotechnol.*, **2010**, 28(7), 647—650
- [ 8 ] Yu B., Zhang T., Xia P., Gong X., Qiu X., Huang J., *Int. J. Mol. Med.*, **2018**, 41(1), 381—390
- [ 9 ] Houldsworth A., *Brain Commun.*, **2024**, 6(1), fcad356
- [10] Manczak M., Reddy P. H., *Hum. Mol. Genet.*, **2012**, 21(23), 5131—5146
- [11] Jin S. C., Lewis S. A., Bakhtiari S., Zeng X., Sierant M. C., Shetty S., Nordlie S. M., Elie A., Corbett M. A., Norton B. Y., van Eyk C. L., Haider S., Guida B. S., Magee H., Liu J., Pastore S., Vincent J. B., Brunstrom-Hernandez J., Papavasileiou A., Fahey M. C., Berry J. G., Harper K., Zhou C., Zhang J., Zhao B., Li H., Heim J., Webber D. L., Frank M. S. B., Xia L., Xu Y., Zhu D., Zhang B., Sheth A. H., Knight J. R., Castaldi C., Tikhonova I. R., López-Giráldez F., Keren B., Whalen S., Buratti J., Doummar D., Cho M., Retterer K., Millan F., Wang Y., Waugh J. L., Rodan L., Cohen J. S., Fatemi A., Lin A. E., Phillips J. P., Feyma T., MacLennan S. C., Vaughan S., Crompton K. E., Reid S. M., Reddihough D. S., Shang Q., Gao C., Novak I., Badawi N., Wilson Y. A., McIntyre S. J., Mane S. M., Wang X., Amor D. J., Zarnescu D. C., Lu Q., Xing Q., Zhu C., Bilguvar K., Padilla-Lopez S., Lifton R. P., Gecz J., MacLennan A. H., Krüer M. C., *Nat. Genet.*, **2020**, 52(10), 1046—1056
- [12] Ulivieri C., Savino M. T., Luccarini I., Fanigliulo E., Aldinucci A., Bonechi E., Benagiano M., Ortensi B., Pelicci G., D'Elia M. M., Ballerini C., Baldari C. T., *J. Immunol.*, **2016**, 197(2), 480—490
- [13] Lv Y., Sun Y., Wang G. Y., Yin J., Li C. J., Luo Y. Y., Luan Z. L., *Psychiatry Investig.*, **2020**, 17(9), 934—940
- [14] Greenbaum L., Lerer B., *Mol. Psychiatry*, **2009**, 14(10), 912—945
- [15] Vaishnavi S. N., Vlassenko A. G., Rundle M. M., Snyder A. Z., Mintun M. A., Raichle M. E., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2010**, 107(41), 17757—17762
- [16] Bas-Orth C., Tan Y. W., Lau D., Bading H., *J. Biological Chem.*, **2017**, 292(13), 5183—5194
- [17] Myers M. G., Olson D. P., *Nature*, **2012**, 491(7424), 357—363
- [18] Libro R., Bramanti P., Mazzon E., *Life Sci.*, **2016**, 158, 78—88

(Ed.: Y, K, S)