

## 报告正文

参照以下提纲撰写，要求内容翔实、清晰，层次分明，标题突出。  
请勿删除或改动下述提纲标题及括号中的文字。

### （一）立项依据与研究内容（建议 8000 字以下）：

1. 项目的立项依据（研究意义、国内外研究现状及发展动态分析，需结合科学研究发展趋势来论述科学意义；或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录）；

#### 1.1 研究意义

精神分裂症（schizophrenia, SZ）是一种严重的慢性致残性精神疾病。既往的遗传学研究表明，精神分裂症是受多重基因影响的复杂遗传性疾病，是具有不同病理学基础的异源性疾病的最终表现形式。然而即使是精神分裂症的单卵双生子研究，也只发现共病率仅接近 50%<sup>[1]</sup>，这是因为遗传风险中的很大一部分尚未阐明的因素包括未知的环境因素以及更为复杂的基因-环境交互作用，而环境事件的流行病学调查存在随机发生、回溯困难等问题，全面系统地揭示精神分裂症的病因仍然任重道远。

表观遗传修饰是指在保持基因 DNA 序列不变的情况下改变基因表达，精神分裂症中相当一部分表观遗传修饰可通过许多环境因素获得，表观遗传修饰可能是环境因素影响精神分裂症表型异质性的分子基础<sup>[2]</sup>。DNA 甲基化是表观遗传调控的常见形式，提供了基因（DNA 序列）和表型（由基因表达和环境因素所决定）间的关键信息界面，是经典遗传学的拓展。Frada 等<sup>[3]</sup>对不同年龄阶段的单卵双生子 DNA 甲基化进行比较，DNA 甲基化差异随年龄增长而增大，3 岁双生子 DNA 甲基化分布模式基本一致，但在 50 岁的双生子间差异非常显著，从而体现了环境对遗传的影响。由此可见，遗传与环境交互作用会影响 DNA 甲基化的调控，是解释环境如何影响和作用这类复杂性状的重要途径。

在我们的前期关于 DNA 甲基化与精神分裂症前脉冲抑制（prepulse inhibition, PPI）缺陷的研究工作中，通过以不共病的精神分裂症单卵双生子为研究对象，最大程度上控制了生殖系遗传变异和相对复杂的环境因素，筛选 PPI 缺陷的候选基因，并通过散发病例验证，发现 N-甲基-D-天冬氨酸（N-methyl-D-aspartic acid,

NMDA)受体亚基编码基因 *GRIN2A* 与 PPI 的相关性具有统计学意义(详见研究基础)。既然 NMDA 受体基因 DNA 甲基化水平可以反映精神分裂症内表型指标缺陷,那么继续以此为切入点探寻精神分裂症病理机制则显得尤为迫切。这也与精神分裂症的谷氨酸假说相符合。

基于文献报道, NMDA 受体功能异常时,将损伤脑微血管内皮细胞,并扰乱细胞间紧密连接,可能导致区域血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)通透性改变<sup>[4-7]</sup>。本项目拟以此为切入点,着重观察 NMDA 受体基因 DNA 甲基化在精神分裂症血脑屏障通透性损伤中的作用。目前获得广泛认可的血脑屏障检测方法是脑脊液/血清蛋白比值(albumin quotient, QAlb),但该测查具有侵入性,对于精神分裂症患者而言可行度较低,且 QAlb 值并非特异性指标,易受脑脊液生成、循环量等因素影响,不能可靠地反映血脑屏障的渗透性。针对此点,本项目还进行了如下三方面设计:首先,一些基于精神分裂症免疫炎症假说上的研究证明了精神分裂症患者确实存在血脑屏障通透性损伤<sup>[8,9]</sup>,因此可纳入血清炎症因子作为分子尺度考察血脑屏障功能;其次,动态对比增强磁共振成像(dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging, DCE-MRI)是一种提供血管信息的体内成像方法,能够提供血管生成相关的生物学信息,已广泛用于癫痫、阿尔茨海默氏病的血脑屏障功能评估当中,本项目也将以此为主要评估手段,为血脑屏障通透性损伤提供了回路尺度视角;第三,早期也曾有脑电监测血脑屏障病变的报道,虽然目前脑电评估血脑屏障已不是首选,然而仍可提供独特的神经元节律尺度的景观。同时传统脑电皆基于线性分析方法,这与脑电是非线性非平稳信号的事实不符。本项目将采用互补集合经验模态分解(complementary ensemble empirical mode decomposition, CEEMD)技术解析脑电本征模态分量,继而结合微状态等方法展开分析,进一步地还可结合希尔伯特-黄变换(hilbert huang transform, HHT)<sup>[10]</sup>构建全息希尔伯特谱(holo-hilbert spectrum analysis methods, HHSA)<sup>[11]</sup>,更全面的反映精神分裂症神经生理缺陷及血脑屏障通透性损伤,以弥补以往脑电研究中的不足。

因此,本项目拟基于精神分裂症 NMDA 受体基因 DNA 甲基化展开研究,运用多尺度研究框架评估血脑屏障功能,探究 NMDA 受体基因 DNA 甲基化在血脑屏障中的作用,进而筛选能够用于识别精神分裂症的生物标志物,促进客观诊断指标的应用。

## 1.2 国内外研究现状及发展动态分析

### 1.2.1 NMDA 受体在精神分裂症发病机制中的作用

神经系统中的 NMDA 受体主要分布在突触后膜，是由四个亚基组成的异四聚结构，其中两个是功能型亚基 NR1，另两个是调节型亚基，可以是 NR2 四种亚型（NR2A-NR2D，由 *GRIN2A-GRIN2D* 编码）和 NR3 两种亚型（NR3A-NR3B，由 *GRIN3A-GRIN3B* 编码）中的两个。在不同的脑区、不同的发育阶段等情况下，NMDA 受体的数量、组成和活性都会有所不同，用以维持平衡稳态去适应不同的环境。一旦这种平衡被打破，失衡的信号通路会引起的恶性循环并最终导致朝向病理性的状态发展。一方面 NMDA 受体介导  $\text{Ca}^{2+}$  内流，增强突触可塑性，提高神经元兴奋性，其功能低下与精神分裂症关系密切，Meta 分析显示精神分裂症首次发病患者的 NMDA 受体抗体水平显著高于健康对照人群<sup>[12]</sup>；另一方面，NMDA 受体过度开放，也将导致  $\text{Ca}^{2+}$  过量内流，形成钙超载，引起细胞功能紊乱，诱发凋亡，或启动细胞死亡信号转导途径。

遗传学研究方面，这一点在 Ripke 等人的 GWAS 研究显示编码 NMDA 受体 NR2A 亚基的 *GRIN2A* 与精神分裂症的发生有关<sup>[13, 14]</sup>。另一项近期研究对 24248 名患者、97323 名对照以及 3402 对父母-子女的新生变异进行了 meta 分析，显示 10 个基因中的罕见变异会给精神分裂症带来巨大的风险，其中就包括 *GRIN2A* 基因<sup>[15]</sup>。

而在表观遗传学方面，在早期隔离饲养的大鼠中，研究者发现与对照组相比，隔离大鼠前额叶皮质和海马的 *Grin1*、*Grin2a*、*Grin2b* 的 mRNA 均降低，前额叶皮质中的 *Grin1* 和海马中的 *Grin2b* 高甲基化。Jaffe 等<sup>[16]</sup>在精神分裂症患者尸脑前额叶皮质中发现 *GRIN2A* 甲基化水平在精神分裂症患者中明显减低。另一项对于首发精神分裂症患者、患者兄弟姐妹以及健康对照的研究显示，首发精神分裂症患者 *GRIN2B* 基因启动子内所有 CpG 都呈现低甲基化，并且与认知功能的缺陷明显相关<sup>[17]</sup>。并且 NMDA 受体基因 DNA 甲基化还易受到环境因素的影响，Engdahl 等<sup>[18]</sup>研究显示，童年逆境与 *GRIN2A* 调控区域的 DNA 甲基化水平提升有关，并且此种影响很有可能随着时间推移持续终生。Loureiro 等<sup>[19]</sup>以首发精神分裂症患者及其未患病的兄弟姐妹、健康对照为研究对象，发现童年创伤的首发精神分裂症患者 *GRIN1* 也存在 DNA 甲基化的异常。

基于上述文献我们可以得知：首先，NMDA 受体与精神分裂症发生发展密切

相关；更重要的是，NMDA 受体基因 DNA 甲基化可以一定程度上反映环境对精神分裂症的影响，对研究遗传-环境因素在精神分裂症发病机制中的作用具有重要意义。

### 1.2.2 精神分裂症患者血脑屏障的损伤及其影响

BBB 可使脑组织少受甚至不受循环血液中某些物质的影响，从而保持脑组织内环境的基本稳定，对维持中枢神经系统正常生理状态具有重要的生物学意义。而精神分裂症患者在疾病状态下，BBB 可能表现出高渗透性，导致物质可以更自由地在中枢神经系统 and 外周循环之间通过。过去大量尸检研究表明，精神分裂症患者的神经血管单位结构存在异常，包括内皮细胞液泡变性、基膜增厚，以及星形胶质细胞数量减少等。Kealy 等<sup>[19-21]</sup>回顾了临床和临床前研究中 BBB 异常与神经精神疾病相关的证据。BBB 的高渗状态将允许外周炎症因子进入中枢神经系统，并可能导致症状的发展。一些精神分裂症患者 QA1b 升高，这也是目前 BBB 通透性增加的金标准<sup>[22]</sup>。另外，S100  $\beta$  蛋白是一种中枢神经系统特异蛋白，主要由星形胶质细胞分泌，几乎不在正常人的血清中检测到。因此，血清 S100  $\beta$  浓度升高通常被认为存在 BBB 损害。研究发现，精神分裂症患者的血清中 S100  $\beta$  蛋白浓度显著高于健康对照组，从而证明了精神分裂症患者存在 BBB 损伤<sup>[23]</sup>。

在动物研究中，那些明显更容易受到压力影响的小鼠表现出 claudin-5 的下调，而 claudin-5 对伏隔核中的 BBB 完整性起到重要作用<sup>[24]</sup>。此外，不仅细胞因子可以通过缺损的 BBB 扩散，免疫细胞本身也是如此。例如，源自骨髓或脾脏的外周单核细胞可以进入大脑<sup>[25]</sup>。一些骨髓来源的单核细胞甚至可能在之后分化成小胶质细胞<sup>[26, 27]</sup>。Cai 等<sup>[28]</sup>根据先前采集的外周炎症标志物水平将样本分为两组高炎症与低炎症组。其中高炎症组的脑组织血管内皮粘附因子增加，腹内侧前额叶皮质的脑实质和脉管系统中存在巨噬细胞。

动态对比增强磁共振成像（DCE-MRI）可通过局部组织成像对比来反映局部组织微循环灌注情况，近年来已成功应用于多种神经系统疾病的 BBB 通透性的测量。具体原理是，在静脉注射造影剂前后，造影剂通过破损的 BBB 进入血管外间隙，导致局部影像改变。利用相应的数学模型和药代动力学参数，可以进一步分析时间-信号强度曲线，从而得到定量评估 BBB 通透性的参数。这些参数包括容量转移常数（volume transfer constant,  $K^{trans}$ ）、血管外细胞外间隙容积分数（extravascular extracellular space fractional volume,  $V_e$ ）等， $K^{trans}$  和  $V_e$  值表示 BBB

通透性的增加。Cheng 等<sup>[8]</sup>通过 DCE-MRI 技术评估精神分裂症患者的 BBB 通透性，精神分裂症患者双侧丘脑  $K^{trans}$  显著高于健康对照人群，并与疾病持续时间、症状严重程度正相关，进一步的丘脑亚区显示，丘脑内侧核和外侧核 BBB 损伤显著。这些发现可能有助于我们对精神障碍疾病患者大脑的潜在病理生理机制的了解，同时也提示**血脑屏障通透性损伤可能是精神疾病重要的病理生理特征**。

### 1. 2. 3 NMDA 受体基因参与精神分裂血脑屏障通透性损伤

神经血管内皮细胞通过紧密连接蛋白（tight junctions, TJ）相互连接，是维持 BBB 结构和功能的重要贡献者，其表达与空间分布与 BBB 的功能密切相关<sup>[29]</sup>。近期研究显示，NMDA 受体的过度激活是导致神经血管内皮细胞功能障碍的原因之一<sup>[7]</sup>，过量的  $Ca^{2+}$  进入脑内从而启动多酶级联反应和炎症反应，导致内皮血管通透性增加，而神经血管内皮细胞损伤会导致 BBB 的损伤，引发脑部疾病的发展。Yu 等<sup>[6]</sup>研究发现，NMDA 受体过度激活通过 Rho/ROCK 信号通路影响 TJ，进而造成 BBB 通透性损伤。更进一步的证据显示，*GRIN1*、*GRIN2A*、*GRIN2B*、*GRIN2C*、*GRIN2D* 基因启动子区域呈低甲基化，影响人脑微血管内皮细胞的生成与转化<sup>[30]</sup>。

鉴于目前尚未有 NMDA 受体基因 DNA 甲基化与精神分裂症血脑屏障功能障碍的报道，考虑到心血管疾病也同样存在内皮细胞功能损伤，并且精神分裂症共病心血管疾病风险也较高，可以合理推测精神分裂症和心血管疾病可能存在某些共同的枢纽基因与内皮功能关系密切。我们对人类动脉粥样硬化的数据集 GSE46394<sup>[31]</sup>和精神分裂症的数据集 GSE84727<sup>[32]</sup>进行集成生物信息学分析，采用加权共甲基化网络分别筛选与疾病相关的关键模块并提取其中基因，其中有 65 个基因是两种疾病所重叠的，基于此 65 个基因构建蛋白质-蛋白质互作网络，利用 cytoscape 软件 cytoHubba 包筛选 TOP10 Hub 基因（详见研究基础）。其中排序第一的是 *GRIN2A* 基因。综合上述文献报道及预实验结果，我们推测 **NMDA 受体基因 DNA 甲基化可能参与影响紧密连接蛋白水平，进而造成血脑屏障通透性改变**。

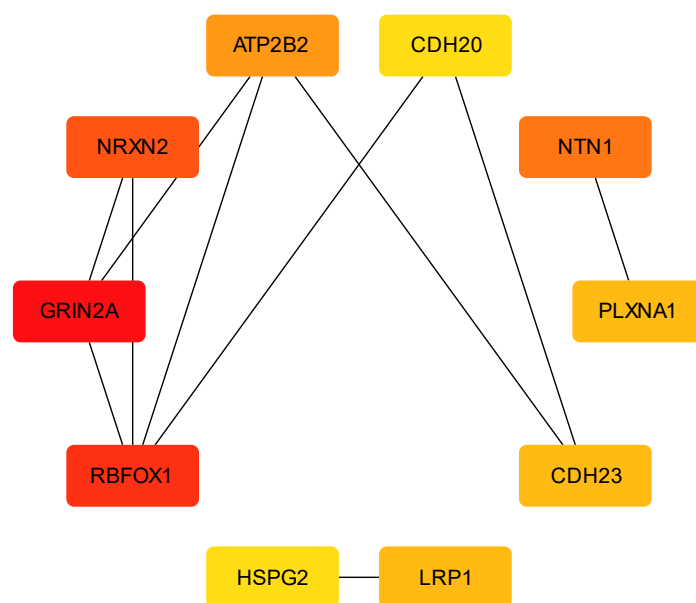


图 1 基于集成生物信息学策略的筛选精神分裂症和心血管疾病共同的枢纽基因

### 1.3 本研究的设想与假说

由于精神分裂症疾病本身存在着诸多遗传异质性、等位基因异质性以及临床异质性问题，全面系统地揭示精神分裂症的病因仍然任重道远。DNA 甲基化为研究者提供了一个绝好的信息界面，帮助理解和探究遗传-环境因素对疾病的映射。虽然在体研究无法提供脑组织的 DNA 甲基化水平，但鉴于诱发脑组织基因表达变化的常见环境因素通常也是同时作用于外周组织的，并且许多表观遗传机制在组织之间可能是相对保守的。Lin 等<sup>[33]</sup>发现同时脑组织与外周组织存在一个共享的 DNA 甲基化网络。因此，精神分裂症的环境暴露因素会同时在中枢和外周组织中留下印记，通过研究外周组织表观遗传变化也可用于揭示疾病相关损伤的病理机制。

另一方面，精神分裂症的血脑屏障通透性损伤涉及多个尺度，对疾病的影响广泛且深刻。而在缺乏安全有效的金标准的情况下，如何利用多尺度框架，评估血脑屏障功能成为需要解决的关键问题。我们打算借鉴潜变量建模的思路，在没有金标准可用的情况下，血脑屏障功能就成为了实际意义上的无法直接观测的潜变量，需要借助外显的测量指标，比如血清炎症因子、磁共振、脑电等多个特征来帮助描绘血脑屏障功能的轮廓。传统的因子分析使用连续的潜变量解释指标间的关联，其前提假设是样本同质，即样本内所有个体享有相同的因子结构。而在精神分裂症的研究中，因为疾病的异质性问题，此时的传统因子分析便不再合适。我们打算采用因子混合模型（factor mixture model, FMM），同时使用因子和潜类

别两种潜变量对观测数据建模，即同时抽取连续和类别因子使得观测指标达成局部独立性。最终基于多尺度特征建模评估血脑屏障功能，再回溯患者的症状行为踪迹，以全面了解精神分裂症的发生和发展机制。

综上，通过系统分析国内外研究现状及发展动态，结合我们前期的工作基础，我们提出假说：**NMDA 受体基因 DNA 甲基化在精神分裂症血脑屏障通透性损伤的病理机制中发挥重要作用**。我们将基于多尺度特征构建因子混合模型，评估血脑屏障功能，并以此为中心点，以点带面的探究 NMDA 受体基因 DNA 甲基化在精神分裂症发生发展中的作用与机制，解析血清炎症因子、DCE-MRI 以及脑电非线性特征与血脑屏障的关联性，并将其一一映射于 NMDA 受体基因 DNA 甲基化所致的疾病的行为症状表现，具有重要的科学意义和潜在的临床价值。

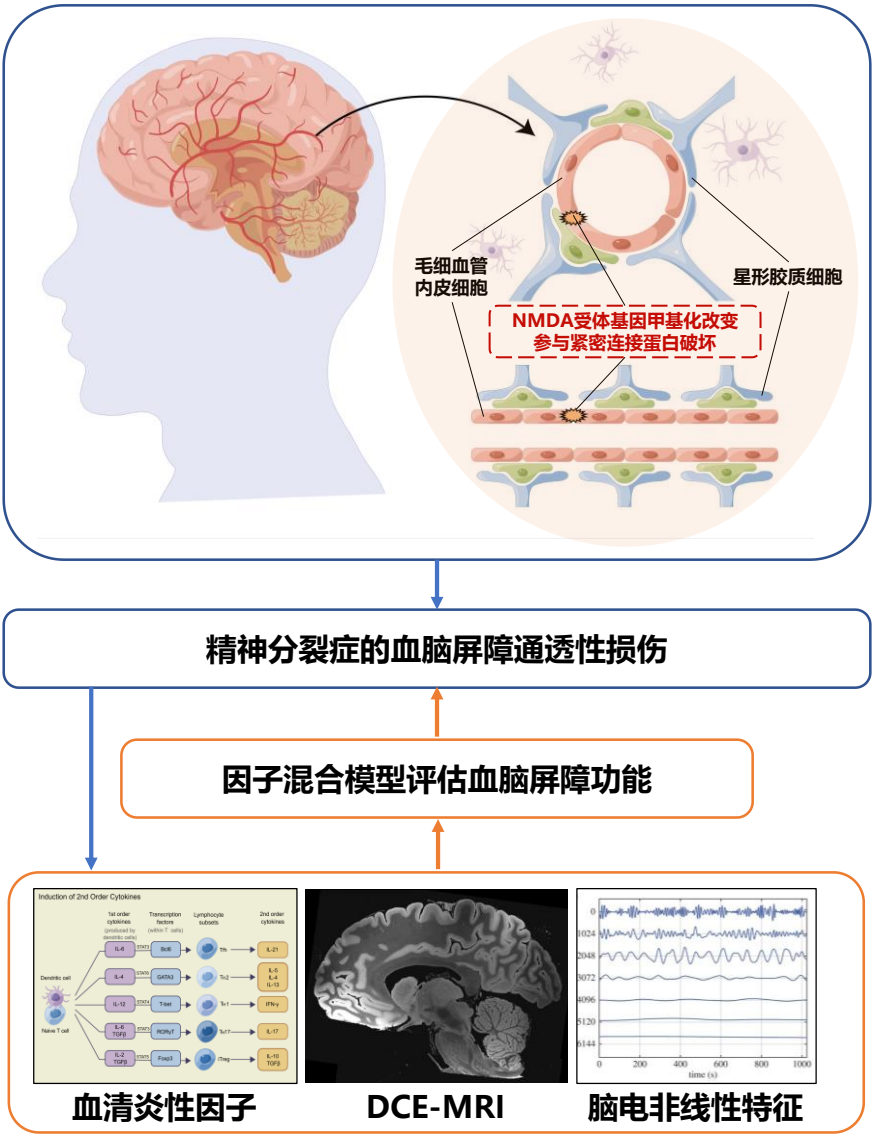


图 2 假说图：NMDA 受体基因 DNA 甲基化参与精神分裂症血脑屏障通透性损伤



## 参考文献

- [1] Fraga M F, Ballestar E, Paz M F, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,2005,102(30):10604-10609.
- [2] Richetto J, Meyer U. Epigenetic modifications in schizophrenia and related disorders: molecular scars of environmental exposures and source of phenotypic variability[J]. *Biological psychiatry*,2020, 89(3):215-226.
- [3] Li J Z, Vawter M P, Walsh D M, et al. Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions[J]. *Hum Mol Genet*,2004,13(6):609-616.
- [4] Epping L, Schroeter C B, Nelke C, et al. Activation of non-classical NMDA receptors by glycine impairs barrier function of brain endothelial cells[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*,2022,79(9): 479.
- [5] Vazana U, Veksler R, Pell G S, et al. Glutamate-mediated blood–brain barrier opening: implications for neuroprotection and drug delivery[J]. *Journal of Neuroscience*,2016,36(29):7727-7739.
- [6] Yu Y, Wu Y, Wei J, et al. NMDA mediates disruption of blood-brain barrier permeability via Rho/ROCK signaling pathway[J]. *Neurochemistry International*,2022,154:105278.
- [7] Mehra A, Guérit S, Macrez R, et al. Nonionotropic Action of Endothelial NMDA Receptors on Blood–Brain Barrier Permeability via Rho/ROCK-Mediated Phosphorylation of Myosin[J]. *The Journal of Neuroscience*,2020,40(8):1778-1787.
- [8] Cheng Y, Wang T, Zhang T, et al. Increased blood-brain barrier permeability of the thalamus correlated with symptom severity and brain volume alterations in patients with schizophrenia[J]. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*,2022,7(10):1025-1034.
- [9] Cai H Q, Catts V S, Webster M J, et al. Increased macrophages and changed brain endothelial cell gene expression in the frontal cortex of people with schizophrenia displaying inflammation[J]. *Molecular psychiatry*,2020,25(4):761-775.
- [10] Huang N E, Shen Z, Long S R, et al. The empirical mode decomposition and the Hilbert spectrum for nonlinear and non-stationary time series analysis[J]. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A: mathematical, physical and engineering sciences*,1998,454(1971):903-995.
- [11] Huang N E, Hu K, Yang A C, et al. On Holo-Hilbert spectral analysis: a full informational spectral representation for nonlinear and non-stationary data[J]. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*,2016,374(2065):20150206.
- [12] Pearlman D M, Najjar S. Meta-analysis of the association between N-methyl-d-aspartate receptor antibodies and schizophrenia, schizoaffective disorder, bipolar disorder, and major depressive disorder[J]. *Schizophrenia Research*,2014,157(1-3):249-258.
- [13] Stephan, Ripke, Benjamin, et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci[J]. *Nature*,2014, 511(7510)
- [14] Fabbri C, Serretti A. Role of 108 schizophrenia - associated loci in modulating psychopathological dimensions in schizophrenia and bipolar disorder[J]. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*,2017,174(7):757-764.
- [15] Singh T, Poterba T, Curtis D, et al. Rare coding variants in ten genes confer substantial risk for schizophrenia[J]. *Nature*,2022,604(7906):509-516.
- [16] Jaffe A E, Gao Y, Deep-Soboslay A, et al. Mapping DNA methylation across development, genotype and schizophrenia in the human frontal cortex[J]. *Nature neuroscience*,2016,19(1):40-47.
- [17] Fachim H A, Loureiro C M, Corsi-Zuelli F, et al. GRIN2B promoter methylation deficits in early-onset schizophrenia and its association with cognitive function[J]. *Epigenomics*,2019,11(4):401-410.
- [18] Engdahl E, Alavian-Ghavanini A, Forsell Y, et al. Childhood adversity increases methylation in



the GRIN2B gene[J]. Journal of psychiatric research,2021,132:38-43.

[19] Loureiro C M, Fachim H A, Corsi-Zuelli F, et al. The relationship of childhood trauma and DNA methylation of NMDA receptor genes in first-episode schizophrenia[J]. Epigenomics,2021,13(12):927-937.

[20] Hess J L, Tylee D S, Barve R, et al. Transcriptome-wide mega-analyses reveal joint dysregulation of immunologic genes and transcription regulators in brain and blood in schizophrenia[J]. Schizophrenia research,2016,176(2-3):114-124.

[21] Dempster E L, Pidsley R, Schalkwyk L C, et al. Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder[J]. Human molecular genetics,2011,20(24):4786-4796.

[22] 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 medical genomics,2015,8(1):1-12.

[23] Schümberg K, Polyakova M, Steiner J, et al. Serum S100B is related to illness duration and clinical symptoms in schizophrenia—a meta-regression analysis[J]. Frontiers in cellular neuroscience,2016,10:46.

[24] Fisher H L, Murphy T M, Arseneault L, et al. Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for childhood psychotic symptoms[J]. Epigenetics,2015,10(11):1014-1023.

[25] Kebir O, Chaumette B, Rivollier F, et al. Methylomic changes during conversion to psychosis[J]. Molecular psychiatry,2017,22(4):512-518.

[26] Roberts S, Suderman M, Zammit S, et al. Longitudinal investigation of DNA methylation changes preceding adolescent psychotic experiences[J]. Translational psychiatry,2019,9(1):1-12.

[27] Montano C, Taub M A, Jaffe A, et al. Association of DNA methylation differences with schizophrenia in an epigenome-wide association study[J]. JAMA psychiatry,2016,73(5):506-514.

[28] Ciuculete D, Boström A E, Voisin S, et al. A methylome-wide mQTL analysis reveals associations of methylation sites with GAD1 and HDAC3 SNPs and a general psychiatric risk score[J]. Translational psychiatry,2017,7(1):e1002.

[29] Luo D, Zhao J, Rong J. Plant-derived triterpene celastrol ameliorates oxygen glucose deprivation-induced disruption of endothelial barrier assembly via inducing tight junction proteins[J]. Phytomedicine,2016,23(13):1621-1628.

[30] Goyal D, Goyal R. Angiogenic transformation in human brain micro endothelial cells: whole genome DNA methylation and transcriptomic analysis[J]. Frontiers in Physiology,2019,10:1502.

[31] Zaina S, Heyn H, Carmona F J, et al. DNA methylation map of human atherosclerosis[J]. Circulation: Cardiovascular Genetics,2014,7(5):692-700.

[32] Hannon E, Dempster E L, Mansell G, et al. DNA methylation meta-analysis reveals cellular alterations in psychosis and markers of treatment-resistant schizophrenia[J]. Elife,2021,10:e58430.

[33] Ruzicka W B, Subburaju S, Benes F M. Circuit-and diagnosis-specific DNA methylation changes at  $\gamma$ -aminobutyric acid-related genes in postmortem human hippocampus in schizophrenia and bipolar disorder[J]. JAMA psychiatry,2015,72(6):541-551.

2. 项目的研究内容、研究目标，以及拟解决的关键科学问题（此部分为重点阐述内容）；

## 2.1 研究内容

### 2.1.1 精神分裂症患者的 DNA 甲基化检测

以首发未用药的精神分裂症患者（first-episode schizophrenia, FES）、健康对照人群（health control, HC）为研究对象，采集人口学、临床、认知、血液、MRI 及脑电数据，采用 Illumina MethylationEPIC BeadChip 甲基化芯片技术建立全基因组 DNA 甲基化谱，着重考察 NMDA 受体基因 DNA 甲基化水平，利用 GO、KEGG 等数据库注释分析基因功能，并与其他尺度资料进行关联性分析。

### 2.1.2 血清炎症因子检测

细胞因子是一种多肽类细胞调节物质的总称，包括白细胞介素、干扰素、生长因子、细胞刺激因子、肿瘤坏死因子等；本研究对细胞因子的检测采用了十二项细胞因子检测试剂盒，使用流式荧光法检测血清中的白细胞介素（IL）-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-12p70、IL-17A、干扰素（INF）- $\gamma$ 、INF- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  的水平。

### 2.1.3 动态对比增强磁共振技术（DEC-MRI）评估血脑屏障通透性

磁共振图像的采集在苏州大学附属广济医院影像科进行，使用西门子 3.0T MR 扫描仪，先行常规 T1 和 T2 MRI 扫描排外明显的头颅结构异常，然后扫描一组 3D BRAVO 序列，随后进行 DCE-MRI 扫描，采用 3D-SPGR 序列（三维扰相梯度回波序列），利用血管及脑组织内造影剂的浓度，测量血脑屏障的造影剂漏失量，采用 patlak 模型对  $K^{trans}$  值进行计算来反映血脑屏障的通透性。

### 2.1.4 脑电数据采集及非线性特征提取

脑电数据采集在苏州大学附属广济医院神经生理实验室进行，使用 EGI 256 导联脑电采集系统。非线性特征提取将采用 CEEMD 抽取原始 EEG 信号的本征模态分量，再针对分量信息进行微状态或全息希尔伯特谱分析。其中全息希尔伯特谱数据处理思路为：其具体思路为：① 对信号做第一次本征模态分解，获得若干个第一层本征模态；② 再对第一层每个本征模态的包络进行第二次本征模态分解，获得若干个第二层本征模态；③ 最后对第一层、第二层的本征模态进行希尔伯特变换求解瞬时频率，获得高维度的 Holo 谱，第一层为载波，第二层为调幅或调频。脑电非线性特征突破了传统分析方法中必需假设信号为线性和稳态的缺点，抽取

更多具有探讨意义的讯息，反映电生理复杂的非线性和非稳态活动。

### **2.1.5 基于潜变量模型研究策略的血脑屏障功能评估模型**

血脑屏障功能事实上已无法直接观测，鉴于血脑屏障通透性损伤对疾病的影响广泛且深刻，通过评测血清炎症因子、DCE-MRI 的容量转移常数以及脑电的非线性指标，间接评估血脑屏障功能已成为唯一方案。在此基础上，通过潜变量研究策略，以血脑屏障功能为潜变量，以分子尺度、回路尺度、神经元节律尺度相关指标为观测指标，就有望通过因子混合模型方法，全面系统的评估血脑屏障功能。

## **2.2 研究目标**

**2.2.1 基于 DNA 甲基化、BBB 损伤、脑电非线性特征开展研究，运用多尺度研究框架，主要研究 NMDA 受体基因 DNA 甲基化参与精神分裂症的发病机制。**

**2.2.2 基于潜变量模型研究策略的多尺度指标构建因子混合模型，为血脑屏障功能的评估提供新思路，相信模型的建立将更有助于深度刻画精神分裂症血脑屏障通透性损伤的生物表征，以期促进客观诊断指标的应用。**

## **2.3 拟解决的关键科学问题**

### **2.3.1 NMDA 受体基因 DNA 甲基化参与精神分裂症血脑屏障通透性损伤**

根据既往研究报告和前期集成生物信息学分析结果显示，NMDA 受体过度激活通过 Rho/ROCK 信号通路影响 TJ 的表达，进而造成 BBB 通透性损伤；同时，受体基因启动子区域呈低甲基化，影响人脑微血管内皮细胞的生成与转化；*GRIN2A* 可能是精神分裂症和心血管疾病与内皮功能关系密切的共同的枢纽基因。因此我们所提出的：NMDA 受体基因 DNA 甲基化参与了血脑屏障通透性损伤，具有较充足的理论依据，值得我们以此为中心，由点及面的深入解析 NMDA 受体基因 DNA 甲基化介导的血脑屏障通透性损伤。这一研究可能有助于更深入地描绘疾病的发生机制，为相关疾病的治疗提供新的理论依据和实践指导。

### **2.3.2 基于多尺度框架的血脑屏障功能评估**

包括精神分裂症在内的精神疾病血脑屏障功能评估的难点在于：获得共同认可 QAlb 测查具有侵入性，且并非完全可靠；影像学策略对精神分裂症此类血脑屏障微损伤微渗漏可能评估有限。多尺度框架的优势在于，能基于血脑屏障的损伤，较细致较全面的勾勒血脑屏障通透性损伤的轮廓，于细节处见微知著。以潜变量模型的研究策略，以多尺度指标为观测变量，构建因子混合效应模型，是解决此

类疾病血脑屏障微渗漏功能评估问题的新思路，具有深刻的探索和指导意义。

### 3. 拟采取的研究方案及可行性分析（包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明）；

#### **3.1 研究方法**

##### **3.1.1 研究设计**

本研究拟入组首次发病未用药精神分裂症患者，以及匹配的健康人群。采集两组人群的一般人口学、临床、神经认知、脑电、磁共振、血液等数据。本研究属于观察性研究，不干预患者的治疗方案。

##### **3.1.2 研究对象及入排标准**

###### **3.1.2.1 研究对象招募**

本研究拟招募首次发病精神分裂症患者（FES）、健康人群（HC）各 100 人。要求所有受试年龄在 16-45 周岁，右利手，初中及以上文化程度，智力测试结果正常。所有的受试者都将根据参加试验时间的长短给予一定的经济补助。本研究得到苏州大学附属广济医院伦理委员会的批准。

###### **3.1.2.2 入组标准**

共用部分：自愿签署知情同意书并已从研究方案；右利手，年龄在 16-45 岁之间；初中及以上文化程度，智力测试正常（ $IQ \geq 75$ ）；无酒精和药物滥用史；无神经精神系统疾病家族史（脑血管意外除外）；目前无明确诊断的神经系统和其他严重躯体疾病病史。FES：符合 DSM-5 精神分裂症诊断标准，病程 $<3$  年且未经过系统抗精神病药治疗者。HC：符合 DSM-5 未患有任何精神疾病标准。

###### **3.1.2.3 排除标准**

共用部分：体格检查和实验室生化指标或脑电图、心电图严重异常者；妊娠或哺乳期女性，随访期间有可能怀孕的女性；因其他躯体疾病不能中断使用药物者；3 个月内参加过其他科研治疗、献血或作为被试被采血者；极度兴奋、冲动、不合作者；研究者认为被试在研究过程中会有自杀或暴力行为者；6 个月内接受过电抽搐或磁刺激治疗者。FES：目前无明确判断的除精神分裂症外的其他精神疾病；当前或曾经服用过抗精神病药、抗抑郁药、中枢兴奋剂、情感稳定剂治疗者。HC：现在或既往被诊断患有精神障碍者；现在或既往被诊断为脑器质性或躯体疾病所致或精神活性物质所致所致精神障碍；当前或曾服用过抗精神病药、抗抑郁药、

中枢兴奋剂、情感稳定剂治疗者。

### 3.1.3 样本量估算

计划纳入两组被试，采用单因素方差分析比较各组间均值，使用 PASS 软件计算，按  $\alpha=0.05$ 、 $\beta=0.1$ ，两组被试样本量相等计算所需样本量。基于前期文献对各指标的评估，以所需样本量最大的指标作为样本量估算基准。最后我们采用右侧颞中回颞极的  $K^{\text{trans}}$  值（正常人群  $1.50\text{E-}03 \pm 5.12\text{E-}04$ ，精神分裂症人群  $2.05\text{E-}03 \pm 1.05\text{E-}3$ ）计算样本量，每组被试需 36 例。计算公式如下：

$$n = \psi^2 \left[ \sum_{i=1}^k s_i^2 / k \right] / \left[ \sum_{i=1}^k (\bar{X}_i - \bar{X})^2 / (k-1) \right]$$

此外，参考已有多指标研究，考虑到被试脱落等情况，按照实验设计每组各纳入 100 例受试者，保证足够的检验功效水平。

### 3.1.4 技术路线图（图 3）

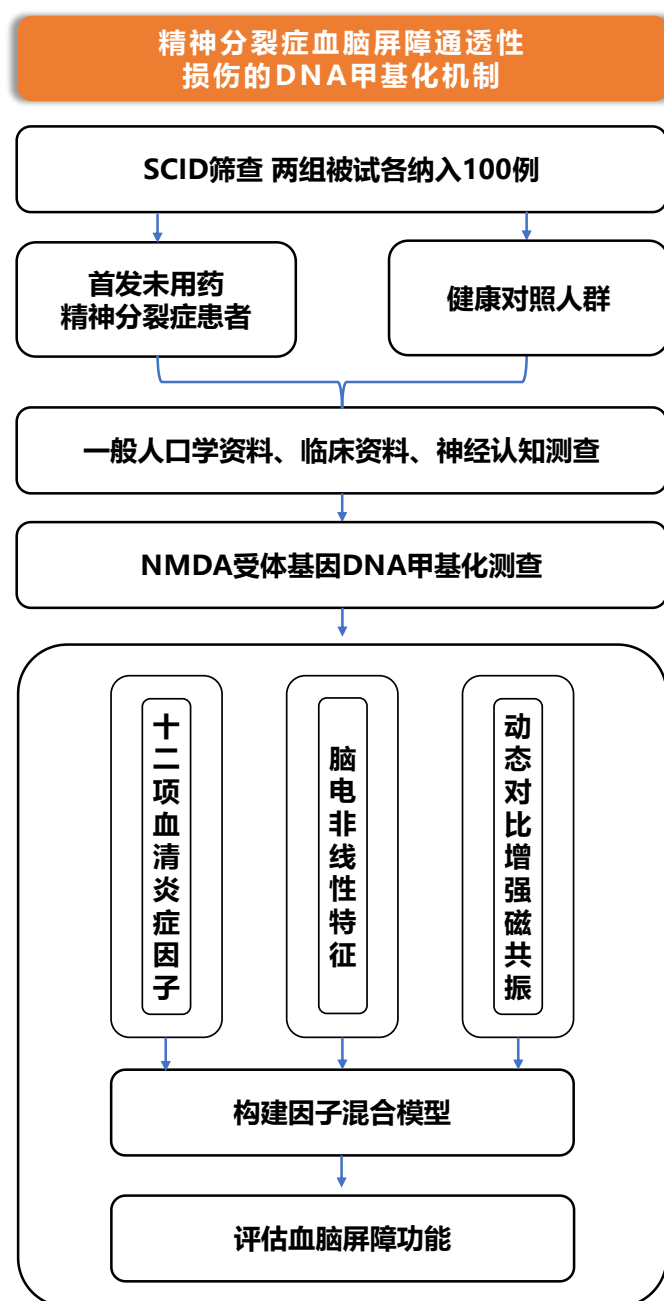


图3 技术路线图

### 3.1.5 实验手段

#### 3.1.5.1 一般人口学资料及临床资料收集

通过自制问卷的形式，由主试询问被试的一般人口学资料，如被试为患者还将询问临床资料（如 PANSS 量表）等。由 2 名经严格培训并实施一致性评定合格的临床医师施测。

#### 3.1.5.2 认知测查

采用 MATRICS 共识认知成套测验（MATRICS Consensus Cognitive Battery, MCCB），测试的认知维度包括：信息处理速度、注意/警觉、工作记忆、词语学习、

视觉学习、推理和问题解决、社会认知。由 3 名经严格培训的主试进行施测。为避免被试疲劳，中间可有 5~10 分钟的休息。

### 3.1.5.3 Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip (850k) 甲基化芯片检测

Illumina 850k DNA 甲基化芯片采用重亚硫酸盐方法识别 DNA 甲基化位点，到达单碱基分辨率，可检测人全基因组约 853,307 个 CpG 位点的 DNA 甲基化状态，不但保持了对 CpG 岛，基因启动子区的全面覆盖，还特别加强了增强子区（新增了 333,265 个探针覆盖来自 ENCODE 及 FANTOM5 计划的增强子）以及基因编码区的探针覆盖。实验流程包括：样品质检；亚硫酸盐转化；DNA 扩增；DNA 片段化、沉淀、重悬；DNA 与芯片的杂交；芯片清洗、单碱基延伸、染色；芯片扫描和数据提取。

### 3.1.5.4 血清炎症因子检测

本研究对细胞因子的检测采用了十二项细胞因子检测试剂盒，基于免疫荧光技术，先使用定量标准品稀释后重悬，轻轻混匀后分别分装到 10 支上样管中，浓度分别为  $1:1-1:2^{n-1}$ ，将捕获微球混合液用低速离心机 200g 离心 5 分钟，吸走上清并加入等量微球缓冲液，混匀后避光孵育 15 分钟，再次混匀后在每个实验管中加入 25uL，将 10 个标准品实验管待测；样本管中每管加入 25uL 的待测样本，混匀后避光孵育 1 小时，在每支标准管及实验管各加入 25uL 的荧光检测试剂，避光孵育 2 小时；所有管中加入 1ml PBS 溶液，200g 离心 5 分钟后吸去上清，每管加入 100uL PBS 溶液，将所有管放在校准好的流式细胞仪上进行荧光检测；10 个标准品管所得结果制作标准曲线控制结果准确性。

### 3.1.5.5 动态对比增强磁共振检查

磁共振图像的采集在苏州大学附属广济医院影像科进行，使用西门子 3.0T MR 扫描仪，先行常规 T1 和 T2 MRI 扫描排除明显的头颅结构异常，然后扫描一组 3D BRAVO 序列，随后进行 DCE-MRI 扫描，采用 3D-SPGR 序列（三维扰相梯度回波序列），TR 5.9ms，TE 2.0ms，翻转角  $2^\circ$ 、 $5^\circ$ 、 $14^\circ$ ，层厚 4.0mm，间隔 0，层数 40 层，矩阵  $256 \times 180$ ，FOV  $24 \times 20.4$ 。每个翻转角度各扫描 5 期，每期用时 13s，在翻转角度  $14^\circ$  第 5 期开始动态增强扫描，经肘静脉以高压注射器以 0.05mmol/kg 的总量注入增强对比剂钆喷酸葡胺，流速 3.0ml/s，同时继续扫描，注射完毕后立即以同样的速率注入相同计量的生理盐水，每期扫描时间为 13 秒，连续无间距扫描 50 期，总扫描时间约 650 秒。常规增强扫描：DEC-MRI 扫描完成



后行常规增强扫描，包括轴位、冠状位、矢状位 T1FLAIR+C 序列。

### 3.1.5.6 脑电数据采集

在相对安静的环境下，采用 EGI 256 导脑电采集系统，采样频率为 1000Hz，Cz 作为记录参考电极。保证头皮电阻在 50 k $\Omega$  以下。带通低频滤波 1Hz，高频滤波 80Hz。采集睁眼/闭眼各 5 分钟静息态脑电。

## 3.1.6 数据管理

### 3.1.6.1 数据库建立

受试者完成试验前，就应当记录数据并进行编辑。试验记录表的收集，编辑和数据录入应在研究过程中持续进行。试验记录表收集后，应用 EpiData 软件建立数据库。双人双录入，一致性检验核查数据。关于数据的任何问题都用数据澄清表来交流。在宣布清理文件完成前，必须根据数据验证原则进行数据的验证，并研究人员的协助下根据数据明确原则核实每位受试者的数据。宣布清理完成后，锁定数据库。

### 3.1.6.2 质量控制

3.1.6.2.1 门诊及住院的首次发病精神分裂症患者均由 2 名以上高年资医师（至少 1 名主任医师）共同确诊，诊断标准采用 DSM-V 符合精神分裂症的诊断标准。不同量表的检测均有专门培训的人员严格按照检测工具的操作规程完成。

3.1.6.2.2 所有脑电、磁共振均采用盲法（即，技术人员不知受试者是哪一组），在同一实验室按照操作规范完成，由两名技术操作人员共同读取结果，各项检测的重复一致性 Kappa 值>0.8。盲法质量控制由专人负责，保障技术人员在检测时以及记录相关指标时只知道受试者的编号。

3.1.6.2.3 检测数据由接受培训的数据统计人员录入，并由两人核对录入结果，数据分析采用国际通用的统计软件完成。

## 3.2 关键技术

### 3.2.1 全基因组 DNA 甲基化芯片分析技术

3.2.1.1 将扫描得到的原始数据，通过 GenomeStudio 软件，获得每个位点的原始信号值和 Detection P。

3.2.1.2 数据质控：质控分为位点质控和个体质控。位点质控要求位点在 95% 以上的个体中的 Detection P 小于 0.05，同时去除位于 X,Y 染色体上的位点；个体质控要求个体在 95% 以上位点中的 Detection P 小于 0.05。

3.2.1.3 归一化处理及批次校正：基于质控后数据的原始信号值，使用 R 包 ChAMP 依次进行荧光偏倚校正、quantile 归一化、探针类型偏倚校正。使用 R 包 sva 进行批次校正，同时进行吸烟分数、细胞异质性及其他混杂因素的校正。

3.2.1.4 NMDA 受体基因 DNA 甲基化数据提取：将 CpG 位点命中 NMDA 受体基因的位点，以 dplyr 包相关函数提取。

3.2.1.5 DNA 甲基化水平差异分析：使用 ChAMP 包进行 DNA 甲基化水平差异分析。同时针对多重假设检验问题，计算 FDR 校正的 P 值(Adjust Pval)。差异位点的选取标准：Adjust Pval<0.05（如果所有位点 Adjust Pval 均大于 0.05，或着<0.05 的位点很少，则以校正之前的 P 值 Pval<0.05 为标准）。将差异 CpGs 位点映射到基因的启动子，如果位于启动子区的差异 CpGs 均为高甲基化或低甲基化，则认为该基因为差异 DNA 甲基化基因。

3.2.1.6 GO、KEGG 富集分析：针对首次发病精神分裂症患者与健康对照的差异 DNA 甲基化基因，分别对高甲基化基因和低甲基化基因，使用 metasplice 数据库进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析。

### 3.2.2 动态对比增强磁共振图像数据分析

#### 3.2.2.1 计算模型

脑脊液与血浆白蛋白比值 QAlb 是评估血脑屏障完整性的金标准，但因其非特异性及有创性而难以施展，因此，DCE-MRI 被广泛用于评估血脑屏障通透性，总结既往应用于其他疾病的 DCE-MRI 测量血脑屏障通透性的方法，越来越多且更完善的示踪动力学模型，其目的是估计生理参数，包括血流量、血容量和血管外漏率，利用血管及脑组织内造影剂的浓度，测量血脑屏障的造影剂漏失量，计算出  $K^{trans}$  值来反映血脑屏障的通透性。常用模型包括两室模型和根据两室模型修改的 Tofts 模型，该动力模型将患者病灶处的 ROI 假设为血管内空间和血管外细胞外空间两个隔室的两室模型，组织中造影剂的总浓度取决于两室中的浓度，根据公式  $K^{trans}=K_{ep}/V_e$  获得 DCE-MRI 的定量  $K^{trans}$  (/min) 值，即对比剂从血管（血浆）空间渗漏到血管外细胞外空间的转运系数（即微血管内皮通透率  $P$  和表面  $S$  的乘积： $P \times S$ ）； $K_{ep}$  (/min)：对比剂从血管外细胞外空间返回到血管（血浆）空间的速率常数； $V_e$ ：血管外细胞外空间占整个体素的容积分数。

但是在血脑屏障轻微泄漏的疾病中，由于泄漏引起的造影剂增强作用的幅度和速率极低， $K^{trans}$  值较小，patlak 模型更为精确。既往的研究表明精神分裂症患者

存在血脑屏障通透性损伤，并且这种改变据参考文献推测应属于轻度损伤，故本研究将采用 patlak 模型对  $K^{trans}$  值进行计算。

Patlak 模型可以被看作改良的 Tofts 模型的特例，忽略了从血管外细胞外空间进入血浆空间的反流，因此，它仅允许估计  $K^{trans}$  和  $V_p$  两个参数。在 patlak 模型中，组织中的药物浓度为：

$$\text{公式 1} \quad C_t(t) = v_p C_p(t) + K^{Trans} \int_0^t C_p(\tau) d\tau \quad \text{等式两边同时除以 } C_p(t), \text{ 得到}$$

$$\text{公式 2} \quad \frac{C_t(t)}{C_p(t)} = K^{Trans} \frac{\int_0^t C_p(\tau) d\tau}{C_p(t)} + v_p \quad \text{通过线性回归得到 } K^{trans} \text{ 和 } V_p, \text{ 其中}$$

$V_p$ : 血管（血浆）空间容积分数； $C_p$ : 血管内空间的对比剂浓度随时间变化的关系，该参数由 AIF 测得； $C_t$ : 每一体素中观察到的对比剂浓度随时间变化的关系。

### 3.2.2.2 图像预处理

所有参与者的原始图像都以 DICOM 格式传输到工作站，使用 mricro 软件读取参数，并在 dcm2niigui 软件将翻转角为  $5^\circ$ 、 $14^\circ$  及动态增强（DCE）图像的原始 DICOM 文件转换为 NIfTI 格式；我们拟使用两种方法来计算受试者血脑屏障的通透性：

方法一：逐脑区  $K^{trans}$  算法，使用在 MATLAB 上运行的 SPM12 对每个受试者的翻转角  $5^\circ$  图像以  $14^\circ$  平均图像为标准进行配准对齐，DCE 图像以  $14^\circ$  平均图像及 DCE 的第一张图像为标准进行配准对齐，继而对各序列图像进行平滑，将  $14^\circ$  平均图像分割出灰质、白质模板。

方法二：逐像素  $K^{trans}$  算法，先在 SPM12 软件中，将动态扫描图像的第一张图像作为标准图像，其他  $5^\circ$ 、 $14^\circ$  及 DCE 图像向标准图像进行配准，为了校正 B1 场的不均匀性，在 Ubuntu 系统中将  $5^\circ$ 、 $14^\circ$  的图像利用 FSL 中的 nu\_correct 进行 N3 校正，使校正后得到的不均匀场的均值为 1，即校正前后图像值的总和不变，而后在 SPM12 中以  $91 \times 91$  脑作为标准模板制作 mask。

### 3.2.2.3 脑区 $K^{trans}$ 值计算

使用预处理后的翻转角  $5^\circ$ 、 $14^\circ$  及 DCE 图像，在 MATLAB 中以 patlak 模型为基础，首先手动选取包含血管的 5 层图像，既往对血脑屏障通透性的研究以大脑中动脉为输入动脉，但有研究显示，以基底节层面上的上矢状窦获得的 VIF 能减少部分体积效应和流入假象，且与时间分辨力相比，动脉与静脉的延迟很小，故本研究选取基底节层面上的上矢状窦作为输入血管得出输入函数；其次确定每位

参与者 DCE-MRI 的扫描参数 TR、TE 及每期扫描时间；最后，以 AAL 模板及灰质、白质模板为 mask，根据 patlak 计算模型，对各脑区及灰质、白质  $K^{trans}$  值进行计算，AAL 模板将大脑划分为 90 个 ROI，故可分别计算出 90 个脑区及灰质、白质平均  $K^{trans}$  值。

#### 3.2.2.4 全脑逐像素 $K^{trans}$ 值计算

图像预处理完成后，在 MATLAB 软件中利用可变翻转角法和校正后的  $5^\circ$ 、 $14^\circ$  图像计算出纵向弛豫时间（T1 图）（如公式 3）。

$$\text{公式 3} \quad \frac{1}{T_1} = \frac{1}{TR} \ln \left\{ \frac{\beta \sin \alpha_2 \cos \alpha_1 - \sin \alpha_1 \cos \alpha_2}{\beta \sin \alpha_2 - \sin \alpha_1} \right\}$$

其中  $\beta = S_1/S_2$ 。

再利用公式反解，为了减少动脉输入函数的体积效应和流入假象，我们手动选取基底节层面上包含上矢状窦的 5 层图像，使用自动 VIF 提取方法自动标记上矢状窦，根据 DCE 图像逐像素的得到药物浓度曲线，如公式 4。

公式 4

$$\begin{aligned} E(t) &= \frac{S(t)}{S(0)} - 1 \\ &= \exp(-r_2 C(t) TE) \times \left[ \frac{1 - \exp(-P - Q) - \cos \alpha (\exp(-P) - \exp(-2P - Q))}{1 - \exp(-P) - \cos \alpha (\exp(-P - Q) - \exp(-2P - Q))} \right] - 1 \end{aligned}$$

其中  $P = TR/T_{10}$ ， $T_{10}$  为未使用造影剂之前的纵向弛豫时间， $Q = r_1 C(t) TR$ ，其中  $r_1$  取  $3.7 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ， $r_2$  取  $5.2 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。

自动找到所有在 11 到 33 秒之间（第 6，7 层）到达药物浓度最高点的像素，按照药物浓度最高值的高低由高到低排序，选取前 0.2% 的点，将其药物浓度曲线平均得到输入函数；仍通过前述 patlak 模型计算，通过线性回归得到和  $V_p$ 。

在 SPM12 将每个被试动态扫描的第一个图像和标准空间下的 T1 模板进行配准，同时将配准参数作用在参数图上，以使受试者个体空间的参数图标准化到标准空间，再将所得标准化图像进行平滑，利用 mask 将脑外图像去除。

然后对  $K^{trans}$  图像进行分组，统计分析在 dpabi 软件中进行，使用双样本 t 检验来比较两组间图像的差异。

### 3.2.3 脑电非线性特征的提取

#### 3.2.3.1 CEEMD 方法分解本征模态分量

CEEMD 是基于经验模态分解（empirical mode decomposition, EMD）的信号处理方法。EMD 是一种根据数据自身的时间尺度进行数据分解的方法，比傅立叶

分析和小波分析等方法更加直观，而且可以自动适应不同的输入数据。原始的时间序列数据  $x(t)$  在经过 EMD 后被分解为若干本征模态分量 (intrinsic mode functions, IMFs)  $c_i(t)$  和残差  $R(t)$ 。其中，每一个本征模态分量都满足以下条件：（1）在整个数据集上，极值（包括极大值和极小值）的个数和零点的个数相等或最多相差不超过一个；（2）对任意一点，由极大值定义的包络线和由极小值定义的包络线的平均值等于零。EMD 是一种完全基于数据的方法，不需要任何先验信息，并且能处理非线性和非稳态数据。

CEEMD 就是利用白噪声均值为 0 的特性，通过在分解的过程中多次引入互为相反数的正负白噪声作为辅助噪声，将信号本身的噪声通过多次人为添加的噪声掩盖过去，从而得到更加精准的上下包络线。同时对分解结果进行平均处理，平均处理次数越多，噪声给分解带来的影响就越小，可以很好的解决 EMD 的模式混淆问题，有较好的鲁棒性，在信号处理领域有着广泛的应用。后续针对本征模态分量的处理，我们拟使用两种方法：

方法一：基于多个本征模态分量，通过微状态、去趋势波动分析等非线性解析方法，提取脑电非线性特征；

方法二：基于全息希尔伯特谱分析方法，抽取脑电信号中振幅调制和频率调制信息，解决了之前谱分析方法中不能处理的信号间调制问题。

### 3.2.3.2 基于本征模态分析的脑电非线性特征提取

微状态分析 (Microstate analysis) 是利用对多通道电极的电场分布以分析地形图拓扑结构，是对所有 EEG 电极信号功能状态的全局表征。通过某个时间点地形图所有电极电压值的标准差反映大脑的瞬时电场强度，测量全脑对事件的反应，或描述大脑活动的快速变化。而微状态拓扑结构的转换，也反映了神经元活动模式。

去趋势波动分析 (detrended fluctuation Analysis, DFA) 是一种基于无标度理论的分析方法，用于估计幂律形式的长程时间相关性。此外，振幅动力学与时间平均振荡功率显著独立，表明 DFA 为神经元系统的功能组织提供了独特的见解。也就是说，如果时间序列数据具有缓慢衰减的自相关的非随机时间结构，DFA 可以量化这些相关性的衰减率。

### 3.2.3.3 基于全息希尔伯特谱分析方法的脑电非线性特征提取

首先将所得到的每个本征模态分量取其瞬时的局部最大值并形成包络线

(upper envelope), 将所形成的包路线再进行一次的经验模态分解, 此为第二层的经验模态分解, 如此建构出多维度的振荡频率调控 (frequency modulation, FM) 及振幅振荡频率调控 (amplitude modulation, AM) 的频谱 (图 4)。大脑中复杂的信息可能是振荡频率调控及振幅振荡频率调控交互作用的结果, 而传统分析方法往往容易忽略振幅振荡频率调控的信息, 因此, 使用非线性动态数据分析方法能较完整的体现复杂信号中的讯息。

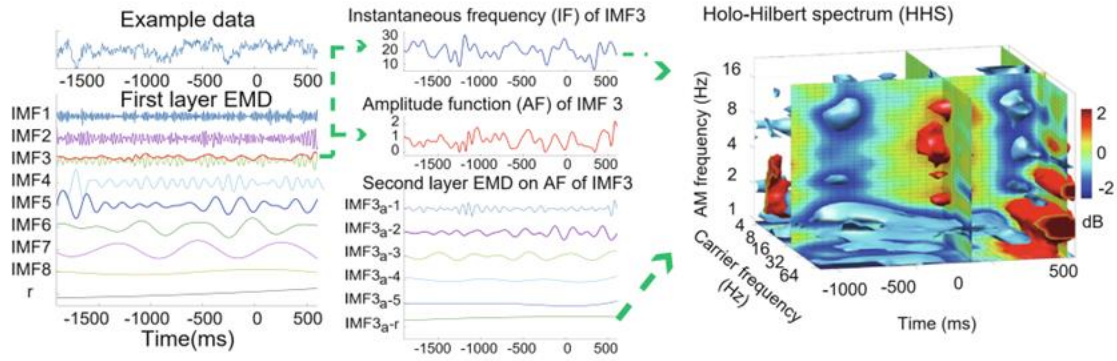


图 4 全息希尔伯特谱分析数据处理流程

### 3.2.4 基于多尺度框架的因子混合模型的构建

因子混合模型的数学表达式与因子分析模型类似, 只是考虑到了群体异质性, 在公式上加了类别变量的下标, 其意指类别特定的因子模型, 公式如下:

公式 5:

$$y_{it} = \tau_t + \Lambda_t \eta_{it} + \varepsilon_{it}$$

$$\eta_{it} = \alpha_t + \zeta_{it}$$

$$\zeta_{it} \sim N(0, \Psi_t)$$

因子混合模型作为新发展的方法在实际研究中的应用并不多, 到目前为止, 尚未形成统一的分析步骤。但就目前为数不多的应用研究来看多数研究采用因子分析、潜类别分析和因子混合模型 3 种模型同时比较的思路, 即同时使用 3 种模型拟合数据, 然后通过比较统计指标选择最优模型。下面按照多数研究者的做法, 总结了因子混合模型的分析步骤:

- ① 拟合因子模型, 逐步增加因子个数以确定最优因子结构;
- ② 拟合潜在类别模型, 逐步增加类别个数以确定最佳替类别模型;
- ③ 根据因子模型和潜类别模型确定因子混合模型的类别数和因子模型;
- ④ 逐渐减少类别个数和因子个数以获取最佳因子混合模型模型;
- ⑤ 比较因子混合模型与因子模型和替类别模型, 以获得最佳的拟合模型。

### 3.3 统计分析方法

DNA 甲基化、血清炎症因子、DEC-MRI 及脑电非线性特征均以回归分析和置换检验 (permutation test) 进行分析, 该过程由 BRB-Array 工具包完成, Permutation  $P < 0.05$  被认为两者具有统计学意义的关联性。Wilcoxon 秩和检验用于计算差异 DNA 甲基化差异位点, 方差分析用于样本组间差异。不同组间频数的差异由卡方或 Fisher 精确检验。主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 用于分析比较 DNA 甲基化模式。中介效应分析用 mediation 包进行。所有检验均采用双侧检验 (two-sided), 我们定义  $P$  小于 0.05 为具有统计学意义。除外特别标识, 统计分析软件均采用 R 软件。

### **3.4 可行性分析**

#### **3.4.1 项目立题具有理论基础**

根据以往研究报道, 我们发现 NMDA 受体的过度激活可以通过 Rho/ROCK 信号通路影响紧密连接蛋白的表达, 从而导致血脑屏障通透性的损伤。同时, NMDA 受体的基因启动子区域呈现出低甲基化的状态, 这可能会影响人脑微血管内皮细胞的生成和转化。此外, 我们通过集成生物信息分析发现, *GRIN2A* 可能是精神分裂症、心血管疾病之间涉及内皮功能的共同枢纽基因。因此, 我们提出了一个新的假说: NMDA 受体基因 DNA 甲基化参与了血脑屏障通透性的损伤。这一假说基于比较完备的理论依据, 值得我们深入探究 NMDA 受体基因 DNA 甲基化介导的血脑屏障通透性损伤的机制和路径。我们相信这项研究可能会为相关疾病的治疗提供新的理论依据和实践指导, 并有助于更深入地描绘这些疾病的发生机制。

#### **3.4.2 项目前期工作基础扎实**

本研究起点源于前期针对 DNA 甲基化在精神分裂症前脉冲抑制缺陷中的作用的研究, 在此研究中我们发现了 NMDA 受体基因 *GRIN2A* 甲基化与前脉冲抑制关系密切, 也引起了我们对 NMDA 受体基因 DNA 甲基化的关注。同时我们查阅文献发现了 NMDA 受体功能可能参与了神经血管内皮细胞及血脑屏障通透性损伤, 因无 NMDA 受体基因 DNA 甲基化与血脑屏障的相关报道, 我们基于精神分裂症和心血管疾病可能存在某些共同的枢纽基因与内皮功能关系密切的推断, 利用集成生物信息分析方法, 发现 *GRIN2A* 位于共同枢纽基因 TOP10 排序第一位。以上预实验显示本研究开展的价值与可行性。

#### **3.4.3 项目实验条件具有保障**

项目承担单位苏州大学附属广济医院是一所拥有百年历史, 集治疗、康复、



防治、教学为一体的三级甲等精神病医院，同时也是苏州市精神卫生中心、苏州市心理卫生中心、苏州市精神疾病临床医学中心。医院病例资源充沛，医院编制床位 1200 张，现有省重点专科 2 个，市级临床医学中心 2 个，市级重点学科 4 个、重点专科 6 个，医院生物精神病学研究中心为市级重点实验室，有电生理、功能影像、分子遗传等研究平台，拥有 3.0t 西门子核磁、导航系统经颅磁刺激仪、PSG、ERP、基因测序仪、RT-PCR 仪、凝胶成像仪、流式细胞仪等大型设备仪器。本研究设有专门的“神经生理实验室”可供使用。已配备隔音消声室、实验数据分析工作站、听觉试验用耳机、声级计、128 导 EGI 脑电设备、256 导 EGI GTEN 神经溯源调控系统、Eyelink 眼动追踪系统等，已顺利开展多项视听觉双通道电生理实验。

#### **4. 本项目的特色与创新之处；**

本项目创新主要包含以下几方面：

##### **4.1 理论创新**

NMDA 受体功能失调，已逐渐成为精神分裂症领域的重要研究方向。然而，NMDA 受体基因 DNA 甲基化与疾病的关联，尤其是与多尺度指标的关联，目前仍未明确，缺乏充分的报道。因此，我们基于文献复习及预实验结果，提出了一个新的假说：NMDA 受体基因 DNA 甲基化参与精神分裂症血脑屏障通透性损伤，我们希望以此为突破口进行深入研究。我们相信，此假说的提出，不仅为精神分裂症的病因学研究提供了新的思路，也将会揭示 NMDA 受体基因 DNA 甲基化与精神分裂症之间的微妙联系，从而为治疗该疾病提供更为科学的理论支持。

##### **4.2 技术创新**

传统脑电分析技术皆基于线性分析方法，这与脑电是非线性非平稳信号的事实不符。为突破此限制，本项目拟采用通过互补集合经验模态分解（CEEMD）技术解析脑电本征模态分量结合微状态等方法展开分析，进一步地还可结合全息希尔伯特谱分析方法，更全面的反映精神分裂症神经生理缺陷，以弥补以往脑电研究中的不足。目前相关脑电分析技术尚无在精神分裂症研究领域报道，本项目的开展将突破传统分析中必需假设信号为线性和稳态的缺点，挖掘更多具有探讨意义的讯息，反映脑电波中复杂的非线性和非稳态活动，具有方法创新意义。

##### **4.3 应用创新**

精神疾病，特别是精神分裂症等相关疾病的血脑屏障功能评估一直以来都是

一个挑战性的问题。现有的方法，如共同认可的 QA1b 调查虽然有其价值，但其侵入性和不可靠性却成为了限制其在临床实践中推广的因素。此外，影像学策略也无法完全评估血脑屏障微损伤微渗漏的情况，这使得评估难度更大。然而，基于多尺度框架的优势，我们可以更加准确地勾勒血脑屏障通透性损伤的轮廓，对微小细节进行深入的研究。通过采用潜变量模型的研究策略，以多尺度指标作为观测变量，构建因子混合效应模型，可以为我们解决精神疾病血脑屏障微渗漏功能评估问题提供一种新的思路。此外，这种新的评估方法不仅能够解决实际临床中的问题，而且对于精神疾病的深入研究也具有深刻的探索和指导意义。通过更加准确地评估血脑屏障功能的微小变化，我们可以更好地理解精神分裂症等疾病的发病机制，为未来疾病的预防和治疗提供更为科学的理论基础。因此，这种多尺度指标的评估方法具有广阔的应用前景和重要的实践价值。

## **5. 年度研究计划及预期研究结果（包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等）。**

### **5.1 年度研究计划**

**2024 年 1~12 月：**进一步复习文献，培训参与本项目人员，做好设备、材料、病例记录表和知情同意书的准备；完成预实验，进一步改进实验流程；开始进行本项目所有准备工作。

**2025 年 1~12 月：**纳入首次发病精神分裂症患者及 50 例匹配的健康对照，采集一般人口学、临床、神经认知等信息，同时采集血液、脑电、影像学数据，并进行预处理。撰写并发表 SCI 论文 1 篇。召开一次学术研讨会，邀请精神医学及相关领域专家对项目开展情况充分交流，之后每年开展一次类似会议，以充分了解相关领域研究进展，及时解决项目中的问题。

**2026 年 1~12 月：**继续纳入 50 例首发精神分裂症患者及 50 例健康对照，收集相关数据，并进行预处理。完成 NMDA 受体基因 DNA 甲基化在精神分裂症血脑屏障通透性损伤的机制探索。撰写并发表 SCI 论文 1-2 篇，申请发明专利 1 项。

**2027 年 1~12 月：**完成本项目基于多尺度框架的血脑屏障功能评价的因子混合模型。撰写并发表 SCI 论文 1-2 篇。项目总结，规划下一步研究。

### **5.2 预期研究结果**

#### **5.2.1 理论成果**

从生物学角度多尺度观察 NMDA 受体基因 DNA 甲基化是如何参与精神分裂症血脑屏障通透性损伤，进一步探寻其表征的病理机制。

### 5.2.2 应用成果

基于多尺度的因子混合模型，可以为我们今后精神疾病血脑屏障微渗漏功能评估建立较好的解决思路。

### 5.2.3 论文发表及专利

在 SCI 收录期刊上发表高质量研究论文 3-5 篇，其中 IF>5 的论文不少于 1 篇；申请发明专利 1-2 项。

### 5.2.4 人才培养

协助培养 1-2 名博士研究生和/或硕士研究生。

## (二) 研究基础与工作条件

### 1. 研究基础（与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩）；

项目申请人多年来一直从事精神分裂症相关的神经电生理研究，在脑电生物标志物的开发方面做了大量深入工作，同时在攻读博士期间掌握了生物信息分析技术，参与了“DNA 甲基化在精神分裂症前脉冲抑制中的作用”相关研究工作。已在相关领域学术杂志期刊参与发表学术 SCI 论文 14 篇，同时作为发明人/设计人参与申请 8 项发明专利。这些前期研究作为本项目的顺利实施奠定了坚实的理论与应用基础。

与本项目相关的研究工作积累和已取得的工作成果如下：

#### 1.1 本项目的部分前期预实验结果

##### 1.1.1 DNA 甲基化在精神分裂症前脉冲抑制缺陷中的作用

本项工作主要分为探索和验证两部分，我们首先以基于公共 DNA 甲基化数据进行了多数据集集成分析，一共筛选出 18 个差异 DNA 甲基化基因。我们再以此结果合并既往研究报道的候选基因，以 5 对不共病单卵双生子为研究对象，对 PPI 和候选基因进行了关联性分析，发现 *C5orf49*、*GRIN2A* DNA 甲基化水平与 PPI 呈现负相关，虽经 BH 校正后 P 值统计学意义不显著。但我们置换检验的方法继续分析 *C5orf49*、*GRIN2A* DNA 甲基化水平与 PPI 的相关性，最终证明 *C5orf49* (P=0.044)、*GRIN2A* (P=0.043) 与 PPI 的相关性具有统计学意义。

第二部分，我们以散发的首发精神分裂症、超高危人群、健康对照的 DNA 甲基化数据，与 PPI 进行相关性分析，验证我们上一阶段筛选出的 *C5orf49* 和 *GRIN2A* 基因 DNA 甲基化可能与 PPI 的相关性。*GRIN2A* 表现出与 PPI 良好的相关性和稳定性，首先是在双生子研究中得到 *GRIN2A* 与 PPI 呈现相关性，后续在散发数据中得到验证。同时通过 WGCNA 共甲基化网络，也验证 *GRIN2A* 是精神分裂症 PPI 缺陷的 hub 基因，是 brown 模块排序第一的 TOP 10 hub 基因（图 5）。

此项工作让我们意识到 NMDA 受体基因 DNA 甲基化与疾病表征关系密切，让促使我们继续探寻其参与精神分裂症发生发展的病理机制。

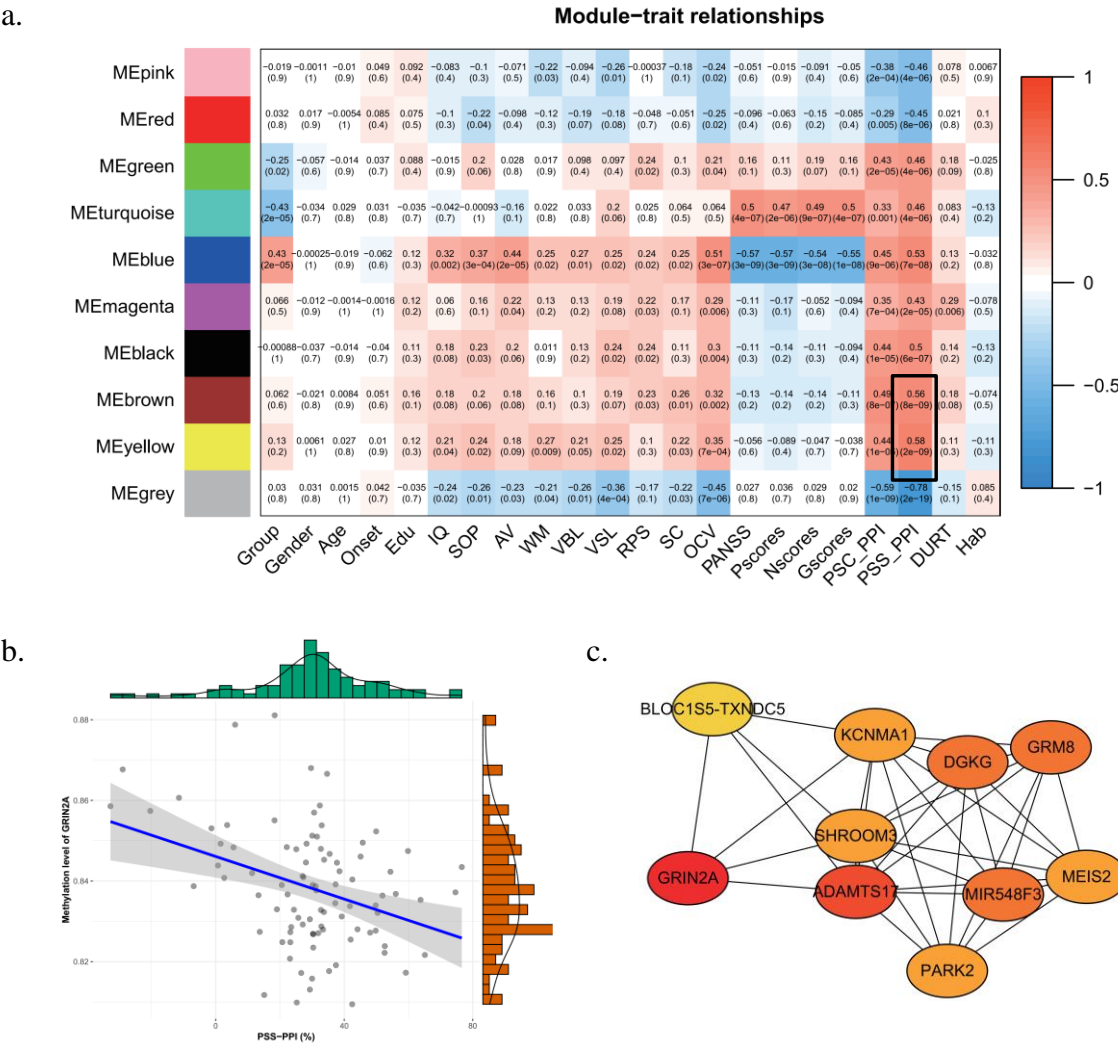


图 5 a) WGCNA 加权共甲基化网络示意图；b) *GRIN2A* 甲基化与 PPI 的相关性， $r=-0.355$ ， $P=0.001$ ；c) brown 模块候选 hub 基因（基于 cytoHubba 计算）

### 1. 1. 2 精神分裂症脑电非线性微状态指标与 NMDA 受体基因甲基化的研究

基于上一部分工作，我们以 5 对首发精神分裂症患者及健康人群为对象，进

行了一个小样本的预实验，用以考察 NMDA 受体基因甲基化与脑电指标的关联。考虑到传统脑电分析方法是基于脑电是现行平稳信号，无法揭示隐藏在非线性特征下的复杂深刻的疾病表征。故而我们采用 CEEMD 技术抽取原始信号的本征模态分量，在此基础上再对分量的脑电地形图进行拓扑结构分析。结果显示，两组被试四种地形图微状态类型的持续时间均存在统计学意义上的差异，并且 Cohen's *d* 值最高达到 3.0 以上（表 1）。同时，此 4 个指标分别与精神分裂症患者 *GRIN2A*、*GRIN2B*、*GRIN2C*、*GRIN3A* 的 CpG 位点甲基化水平的相关性具有统计学意义（图 6），也提示 NMDA 受体基因甲基化参与了精神分裂症患者的脑电非线性特征缺陷。

表 1 首发精神分裂症患者与健康对照微状态持续时间的差异

Microstate features	HC (n=5)	SZ (n=5)	t	p	Cohen's d
Mean Duration of Class A (ms)	69.38 (1.39)	109.28 (16.44)	5.41	< .001	3.420
Mean Duration of Class B (ms)	65.62 (5.02)	109.50 (21.13)	4.52	.002	2.858
Mean Duration of Class C (ms)	79.68 (6.37)	95.05 (9.98)	2.90	.020	1.835
Mean Duration of Class D (ms)	69.03 (6.84)	120.01 (23.07)	4.74	.001	2.996

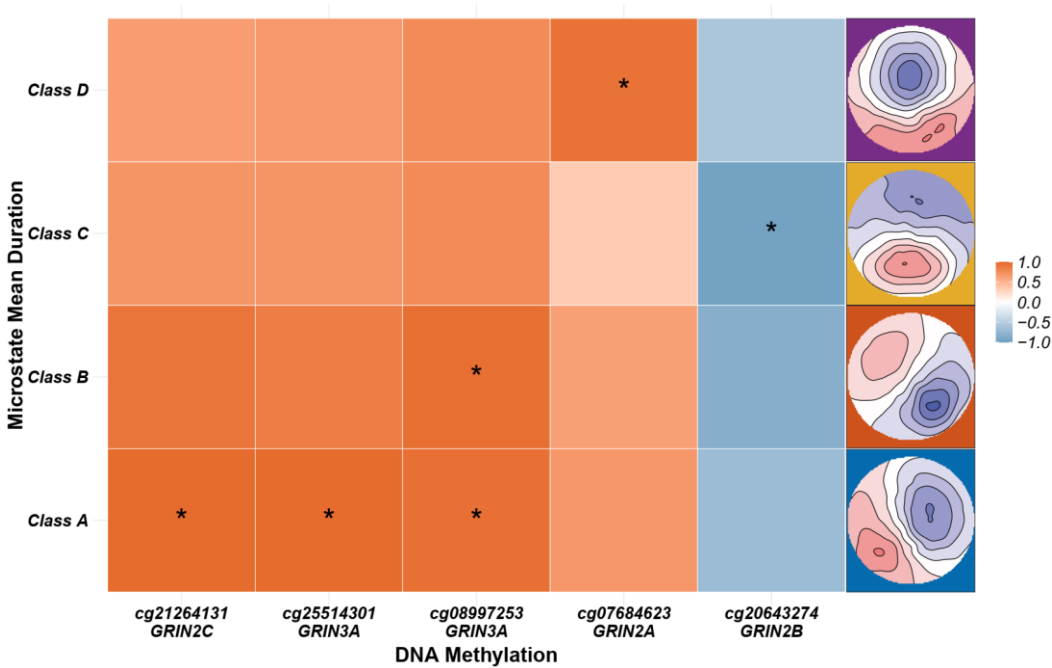


图 6 基于 CEEMD 方法的脑电微状态特征与 NMDA 受体基因甲基化的相关矩阵

1. 1. 3 基于集成生物信息学分析精神分裂症和心血管疾病共同枢纽基因

神经血管内皮细胞对维持血脑屏障功能至关重要，前期文献显示 NMDA 受体



的过度激活将导致神经血管内皮细胞功能障碍，进而我们推测 NMDA 受体基因 DNA 甲基化可能造成血脑屏障通透性受损。因目前暂无基于 NMDA 受体基因 DNA 甲基化与血脑屏障的报道，为验证我们推测的理论可行性，考虑到精神分裂症共病心血管疾病风险较高，且心血管疾病患者也同样易发生内皮细胞功能损伤及血脑屏障受损，如果精神分裂症和心血管疾病存在某些共同枢纽基因，那此类基因很大概率可能与内皮细胞及血脑屏障功能关系密切。我们对人类动脉粥样硬化的数据集 GSE46394 和精神分裂症的数据集 GSE84727 进行集成生物信息学分析，采用加权共甲基化网络分别筛选与疾病相关的关键模块并提取其中基因，其中有 65 个基因是两种疾病所重叠的，基于此 65 个基因构建蛋白质-蛋白质互作网络，利用 cytoscape 软件 cytoHubba 包筛选 TOP10 Hub 基因（图 7）。其中排序第一的是 *GRIN2A* 基因（图 2）。综合文献报道及预实验结果，我们推测 NMDA 受体基因 DNA 甲基化将造成血脑屏障通透性改变。

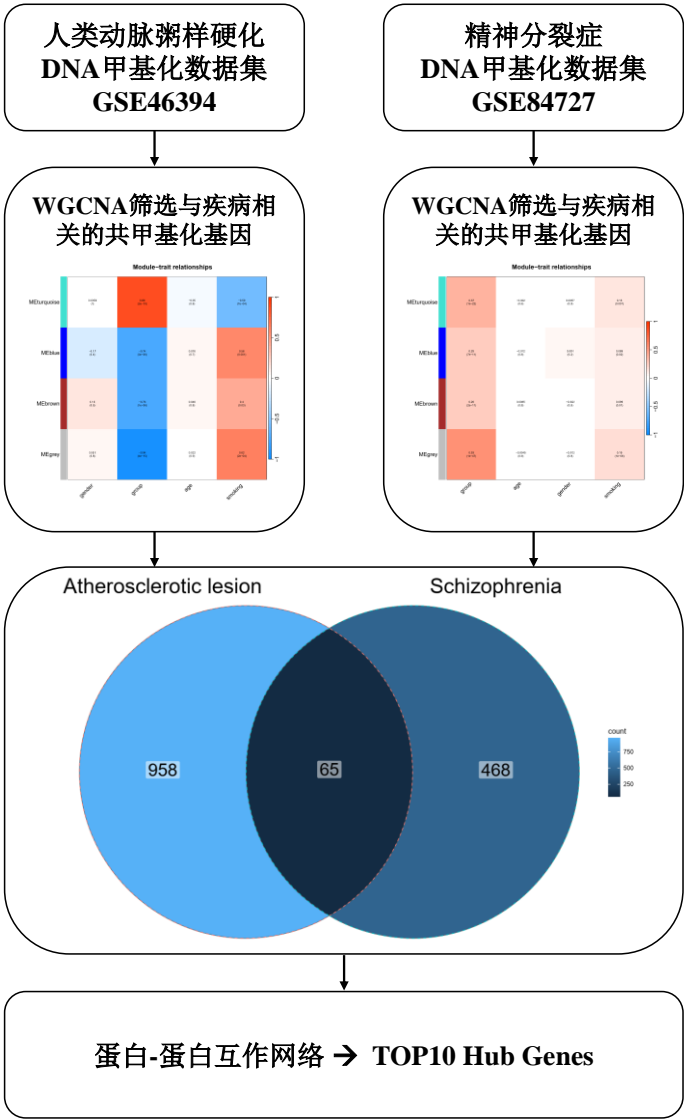


图 7 集成生物学分析流程

## 1.2 已取得的相关研究工作成果

### 1.2.1 精神分裂症神经电生理指标结合神经认知指标构建机器学习模型

通过可重复的成套神经心理状态测量（RBANS）和 Stroop 测试收集神经认知特征，通过静息态脑电（包括定量脑电图、无标度特征 DFA、分形维数等特征 FD）和前脉冲抑制（PPI）收集电生理特征。其中，在认知测查中，即刻记忆、延迟记忆、视觉、语言、注意等认知维度指标，精神分裂症患者与健康人群的差异均有统计学意义。分别以神经认知特征、电生理特征以及这两组的特征组合构建模型，应用 Logistics 回归、随机森林和极端梯度增强算法（XGBoost）通过 10 折交叉验证判断受试者为精神分裂症患者或健康人群的概率。结果显示，在神经认知和电生理特征结合模型中，随机森林算法与 XGBoost 算法总体表现相当，准确率皆为 93.28%，XGBoost 算法 AUC 略高于随机森林算法（97.91% vs. 97.36%）（图 8）。相关论文《Detection of Schizophrenia Cases From Healthy Controls With Combination of Neurocognitive and Electrophysiological Features》在《Frontiers in Psychiatry》，并申请了相关中国发明专利（申请号：CN202111281024.5）。

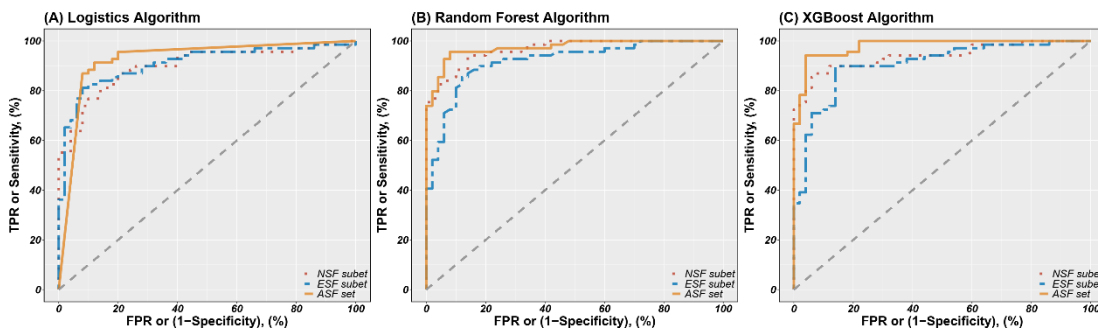


图 8 Logistics、随机森林、XGBoost 算法构建模型的 ROC 曲线

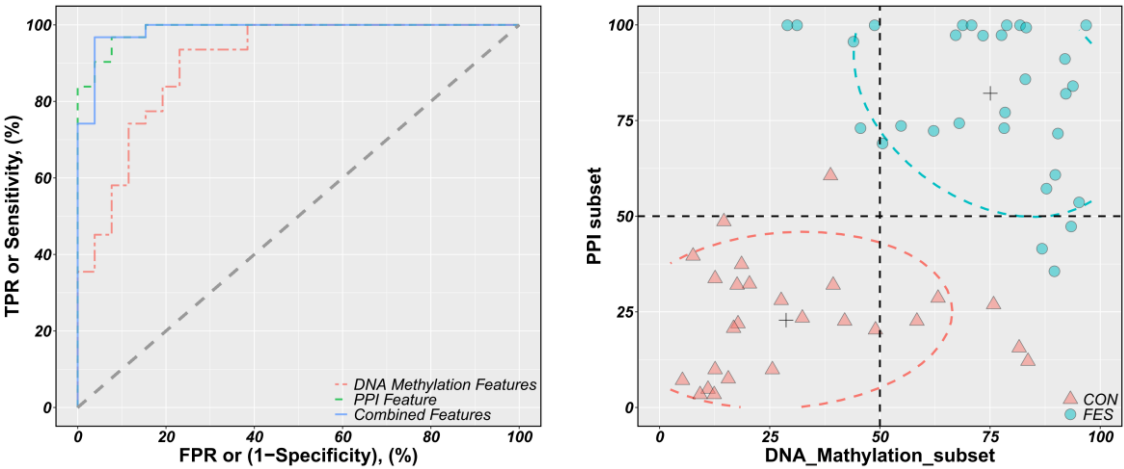
### 1.2.2 联合前脉冲抑制与 DNA 甲基化构建模型的探索

精神分裂症由于其病因的复杂性及症状的异质性，一直缺乏可用于临床实践的客观生物学指标。DNA 甲基化作为表观遗传调控的常见形式之一，是一个基于基因同时又受环境事件影响的指标。而前脉冲抑制（PPI）作为精神分裂症的内表型之一，与疾病的典型行为症状密切相关，同时携带有疾病的遗传负荷。两者都可应用在精神分裂症的病理机制研究中，也可作为临床生物标志物作为疾病预测、诊断、评估的指标。本项工作以首次发病精神分裂症患者和健康对照人群为研究对象，通过 Illumina Methylation EPIC 甲基化芯片收集受试者 DNA 甲基化数据，并采集受试者的前脉冲抑制数据。对 DNA 甲基化数据进行归一化、标准化之后，



利用递归特征消除法筛选特征。分别以 DNA 甲基化特征、前脉冲抑制特征以及这两组的特征组合构建模型，应用随机森林算法通过 10 折交叉验证模型。

DNA 甲基化数据以校正后  $P<0.05$  为阈值，筛选出 18696 差异甲基化位点，经过特征处理共筛得 900 个特征位点用于建模。结果显示，DNA 甲基化模型、PPI 模型、组合特征模型准确率分别为 82.5%、93.0%、94.7%，ROC 曲线下面积(AUC)分别为 90.3%、98.8%、98.6%（图 9）。组合模型表现最优。基于该研究成果已申请 1 项国家发明专利并获授权（DNA 甲基化特征和前脉冲抑制特征在精神分裂症诊断中的应用，中国发明专利，专利号：ZL202111281022.6）。



a. 基于 DNA 甲基化模型、PPI 模型、组合特征模型 ROC 曲线图 b. 首发精神分裂症区分健康人群概率分布图

图 9 a) 横坐标 FPR, Fales Positive Rate, 假正率; 纵坐标 TPR: True Positive Rate, 真正率; 红色代表 DNA 甲基化模型 ROC 曲线; 绿色代表 PPI 模型 ROC 曲线; 蓝色代表组合特征模型 ROC 曲线; b) 横坐标表示 DNA 甲基化模型模拟值, 数值范围自 0~100%, 数值越大代表个体为首发精神分裂症患者概率越高; 纵坐标表示 PPI 模型模拟值, 数值范围自 0~100%, 数值越大代表个体为首发精神分裂症患者概率越高; 红色三角形 CON, 表示个体真实为健康人群; 绿色圆形 FES, 表示个体真实为首发精神分裂症患者

**2. 工作条件（包括已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径，包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实验室等研究基地的计划与落实情况）；**

### **2.1 充沛的病例资源**

项目承担单位苏州大学附属广济医院，是一所大型三级甲等精神专科医院，编制床位 1200 张，年门诊量 36 万人次，年住院 9378 人次，每年入院的首发精神分裂症患者 400-600 例，同时苏州市发展改革委员会、苏州市卫生健康委员会及苏

州市疾病预防控制中心和苏州大学附属广济医院于 2019 年在我院精神卫生研究所内联合共建了苏州市样本库精神疾病分库，至今为止已积累样本量达到 4000 多份，并且临床资料详尽完整。精神疾病分库中已有首发精神分裂症 200 例和健康对照受试者 200 例，再结合我院丰富的临床资源将为本项目获批后的顺利开展提供可靠的保障。

## **2.2 分子生物学实验技术和设备条件**

项目承担单位苏州大学附属广济医院精神卫生研究所主要设置精神生物学、分子遗传学、神经免疫学、精神电生理和精神疾病干细胞和模式动物 6 个实验室和一个影像中心。2016-2019 年医院已投入 5000 万元购置各种先进仪器设备, 2020 年苏州市财政继续支持我院科研平台建设，已下拨建设经费 910 万元。现有仪器设备主要包括：ABI 基因测序仪，ABI QuanStudio 7 Flex PCR 系统、数字 PCR、PCR 扩增仪、凝胶成像系统、核酸浓度检测仪、Thermo 多功能酶标仪、流式细胞器、ThermoQE 质谱、安捷伦气相色谱仪，Thermo 洗板机和自动加液器、高效液相色谱（2 台安捷伦和日本岛津）、莱卡显微镜（3 台）、共聚焦显微镜，膜片钳，Beck 和 Thermo 高速冷冻离心机、电泳仪、冷冻干燥系统、紫外分光光度计、制冰机、三蒸水机、高压设备、烘箱、rTMS+导航（丹麦，2 台）。一个标准化样本库及各种细胞和动物实验设备等，标志着我院已具有开展国家级、省级和厅市级等项目的条件。

## **2.3 神经生理及影像学实验技术和设备条件**

本项目设有专门的“神经生理实验室”可供使用。已配备隔音消声室、实验数据分析工作站、听觉试验用耳机、声级计、128 导 EGI 脑电设备、256 导 EGI GTEN 神经溯源调控系统、Eyelink 眼动追踪系统、3.0T 西门子磁共振成像仪、监听音箱、耳机放大器等，已顺利开展多项视听觉双通道脑电生理、影像学实验。本单位设备能满足本项目拟开展的实验需求，并确保其能顺利完成。

**3. 正在承担的与本项目相关的科研项目情况（申请人和主要参与者正在承担的与本项目相关的科研项目情况，包括国家自然科学基金的项目和国家其他科技计划项目，要注明项目的资助机构、项目类别、批准号、项目名称、获资助金额、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等）；**

无。

4. 完成国家自然科学基金项目情况（对申请人负责的前一个已资助期满的科学基金项目（项目名称及批准号）完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该项目的研究工作总结摘要（限 500 字）和相关成果详细目录）。

无。

### （三）其他需要说明的情况

1. 申请人同年申请不同类型的国家自然科学基金项目情况（列明同年申请的其他项目的项目类型、项目名称信息，并说明与本项目之间的区别与联系）。

无。

2. 具有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在同年申请或者参与申请国家自然科学基金项目的单位不一致的情况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，申请或参与申请的其他项目的项目类型、项目名称、单位名称、上述人员在该项目中是申请人还是参与者，并说明单位不一致原因。

无。

3. 具有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在与正在承担的国家自然科学基金项目的单位不一致的情况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，正在承担项目的批准号、项目类型、项目名称、单位名称、起止年月，并说明单位不一致原因。

无。

4. 其他。

无。