

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.001

• 基础研究 •

叶酸缺乏致胎鼠宫内发育迟缓及肝脏胰岛素生长因子系统表达变化*

李 岫¹ 梁 良² 姚志刚² 王 理¹ 李 睿¹ 梁春联² 刘 驰^{1△}

(1 北京大学首都儿科研究所教学医院 北京 100020; 2 中国医学科学院医学实验动物研究所 北京 100020)

摘要 目的:叶酸是一种水溶性B族维生素,在体内氨基酸与核苷酸代谢中起重要作用,是胎儿生长发育所必须的营养素。本文通过建立叶酸缺乏的孕鼠模型,探讨叶酸缺乏对胎鼠宫内发育的影响,并研究胎鼠肝脏组织中胰岛素生长因子(IGF)系统的表达变化。**方法:**雌性C57BL/6J小鼠叶酸缺乏组6只、正常对照组6只,分别饲以不含叶酸和含2 mg 叶酸/kg的纯合饲料。四周后与雄鼠交配,于怀孕第13.5天(13.5 dpc)对孕鼠剖腹取胎,观察和评价胎鼠发育指标,并对宫内发育迟缓(IUGR)比率进行统计。用Real-time PCR法检测胎鼠肝脏组织中胰岛素生长因子I (IGF I)、胰岛素生长因子I受体(IGF I R)、胰岛素生长因子II (IGF II)、胰岛素生长因子II受体(IGF II R)、胰岛素生长因子结合蛋白1(IGFBP-1)和胰岛素生长因子结合蛋白3(IGFBP-3)mRNA的相对表达水平。**结果:**叶酸缺乏组雌鼠合笼前每日体重增长量降低,13.5 dpc胎鼠吸收胎和死胎比率升高,胎重下降,IUGR比率显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);叶酸缺乏组胎鼠肝脏组织中IGF II和IGF II R mRNA的相对表达水平均低于正常对照组($P<0.05$),IGF I、IGF I R、IGFBP-1和IGFBP-3 mRNA的相对表达水平两组间没有差异($P>0.05$)。**结论:**叶酸缺乏会导致小鼠孕中期胎鼠IUGR比率升高及胎肝IGF II和IGF II R mRNA的表达水平降低,提示叶酸缺乏对IGF系统基因的调控,可能与胎鼠IUGR发生机制有关。

关键词:叶酸缺乏;宫内发育迟缓(IUGR);胰岛素生长因子(IGF)

中图分类号:Q95-3,R723.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)04-601-07

Fetal Mice Intrauterine Growth Retardation Induced by Mmaternal Folate Deficiency and the Expression of Insulin-like Growth Factor System Genes in Fetal Hepatic Tissues *

LI Shen¹, LIANG Liang², YAO Zhi-gang², WANG Li¹, LI Rui¹, LIANG Chun-lian², LIU Chi^{1△}

(1 Peking University Teaching Hospital-Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China;

2 Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science (CAMS), Beijing, 100021, China)

ABSTRACT Objective: Folic acid is a kind of water-soluble B vitamins, and it plays an important role in amino acid and nucleotide metabolism *in vivo*. It is an essential nutrient for fetal growth. The aim of our study is to explore the effects of folate deficiency on fetal growth of mice, and the expressions of Insulin-like Growth Factor(IGF) system in fetal hepatic tissues through a pregnant mouse model of folate deficiency. **Methods:** Female C57BL/6J mice, 6 in the folate deficient group and 6 in the control group, are received a purified diet without or with folate 2 mg Per kg diet. Dams were mated after 4 weeks of feeding. The diets were continued throughout gestation. On day 13.5 of gestation the dams were killed, fetal growth was observed and assayed, and Intrauterine Growth Retardation (IUGR) rate was calculated. The expressions of insulin-like growth factor I (IGF I), insulin-like growth factor I receptor (IGF I R), insulin-like growth factor II (IGF II), insulin-like growth factor II receptor (IGF II R), insulin-like growth factor binding protein1 (IGFBP-1) and insulin-like growth factor binding protein3 (IGFBP-3) mRNA at 13.5 dpc of fetal hepatic tissue were evaluated by Real time RT-PCR. **Results:** The body weight gain per day of maternal mice in folate deficient group was lower than in control group, and the 13.5 dpc fetal weight in folate deficient group was also lower ($P<0.05$). The number of absorbed and dead fetus and the IUGR rate in folate deficient group was higher than those in control group ($P<0.05$). The expressions of IGF II and IGF II R genes mRNA of the study group were significantly weaker than those of the control group in hepatic tissue of the 13.5 day fetuses ($P<0.05$), but there were no difference between the expression of IGF I, IGF I R, IGFBP-1 and IGFBP-3 of two groups($P>0.05$). **Conclusion:** Folate deficiency may inhibit the fetal growth and elevate IUGR rate, and negatively modulates the expressions of IGF II and IGF II R genes of the fetal hepatic tissues.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81102117/H2603; 81000249/H0417)

作者简介:李岫(1986-),男,硕士研究生,主要研究方向:营养与发育健康

△通讯作者:刘驰,E-mail: liuchi. lc@gmail.com

(收稿日期:2013-06-02 接受日期:2013-06-25)

These results suggested that folate deficiency may regulate the expression of IGF genes, and take part in the mechanism of the occurrence of IUGR.

Key words: Folate Deficiency; Intrauterine Growth Retardation (IUGR); Insulin-like Growth Factor (IGF)

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R723.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-601-07

前言

叶酸(folate)是在绿叶蔬菜、谷物和动物肝脏中发现的一种B族维生素,主要参与DNA合成和甲基化过程,对胎儿的生长发育至关重要。近年研究发现,母体低叶酸水平可能会增高胎儿宫内发育迟缓(Intrauterine Growth Retardation, IUGR)的发生率^[1],但其分子机制尚不清楚;以往动物模型的研究提示叶酸缺乏会引起胎鼠重量下降^[2,3],但也没有对其进一步的机制探讨。

目前认为,IUGR的病因是多种因素作用的结果,其病因学包括环境因素和遗传因素。现今很多研究证实胰岛素生长因子(insulin-like growth factor, IGF)^[4]、瘦素(leptin)^[5]、葡萄糖转运蛋白(Glut)^[6]及凝血因子Ⅳ等与胎儿IUGR密切相关^[7]。胰岛素或IGF分泌和功能的异常,是目前研究的热点^[8]。IGF是生长发育所必需的、起重要作用的生长调节因子,是胎儿出生前和出生后生长的主要刺激物,与婴儿出生体重密切相关^[9]。IGF系统包括胰岛素生长因子Ⅰ(IGF-Ⅰ)、胰岛素生长因子Ⅱ(IGF-Ⅱ)、胰岛素生长因子受体Ⅰ(IGF-ⅠR)、胰岛素生长因子受体Ⅱ(IGF-ⅡR)、胰岛素生长因子结合蛋白1(IGFBP-1)和胰岛素生长因子结合蛋白3(IGFBP-3)等,IGF-Ⅰ、IGF-Ⅱ结构类似于胰岛素,是重要的促分裂素,影响细胞生长和代谢,并通过自分泌、旁分泌和内分泌方式影响细胞增殖和分化,调节机体的生长发育^[10]。近期有研究表明,叶酸缺乏会导致孕鼠血清和孕18天胎鼠颅骨中IGF-1蛋白含量降低^[11];韩国Kim HW的一项研究也表明雄鼠叶酸缺乏会导致子代胎鼠脑中IGFⅡ的表达量下降^[12],这说明叶酸缺乏可能会影响IGF系统相关基因的表达水平。

本实验通过建立叶酸缺乏孕鼠模型,研究围孕期母鼠叶酸

缺乏对胎鼠发育的影响,并在叶酸主要存储器官肝脏组织中测定了IGF系统相关基因表达水平,进而对叶酸缺乏致胚胎异常发育的机制进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

C57BL/6J清洁级雌性成年小鼠12只购自中国医科院实验动物中心,饲料配方中的氨基酸、维生素等购自美国Sigma公司。实时荧光定量PCR仪(7500 fast)为ABI公司产品;Nanodrop 1000分光光度计为Thermo Scientific公司产品;引物自上海生物工程有限公司合成;荧光染料SYBR Green I购自康为世纪公司;RNA提取试剂盒购自美国QIAGEN公司;RNA反转录试剂盒购自美国Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 健康清洁级未经产的成年C57BL/6J雌鼠12只,12周龄,体重19.1-21.2 g。按体重排序,随机分为正常对照组(Control)和叶酸缺乏组(FD)两组,每组6只。对照组小鼠喂养饲料以AIN-93G标准饲料配方^[13]为基础,其中氨基酸、矿物质和维生素混合物按Bills N.D.等人建立的氨基酸限定配方^[14]进行调整;叶酸缺乏组小鼠喂养饲料是在对照组基础上剔除掉叶酸,具体成分详见表1。两组小鼠皆自由进水和饮食,所有雌鼠先饲养于普通塑料笼具内单笼喂养,4周后与正常成年C57BL/6J雄鼠1:1合笼交配。每日下午17:00合笼,次日清晨检查阴栓,阴道口有乳白色或黄色凝固物者为见栓,记为E0.5 d,后转入普通饲养笼中,继续喂饲各自饲料直至取材。本研究使用的动物由实验动物使用与管理委员会审查许可(编号:IL-AS-PL-2012-001)。

表1 不同实验组小鼠饲料的基本组成(g/kg)

Table 1 Diet formulated for different groups (g/kg)

饲料成分 Ingredient	正常对照组 Control	叶酸缺乏组 FD
淀粉 Cornstarch	380.500	380.500
氨基酸混合物 Amino acids mix*	200.000	200.000
糊化淀粉 Dextrinized cornstarch	152.000	132.000
蔗糖 Sucrose	100.000	100.000
豆油 Soybean oil	70.000	70.000
纤维 Fiber	50.000	50.000
矿物质混合物 Mineral mix*	35.000	35.000
维生素混合物 Vitamin Mix*	10.000	—
剔除叶酸的维生素混合物 w/o Folate Vitamin Mix*	—	10.000
胆碱酒石酸盐 Choline bitartrate	2.500	2.500

注:* 具体成分参见文献^[14]。

Note: *For the concrete components see the 14 reference.

1.2.2 实验记录及取材 每周用电子天平称量雌鼠体重,准确至小数点后一位数。取材时间为孕 13.5 天(13.5 dpc)当天的 8:00~10:00,记录孕鼠每窝总胎数、活胎数、吸收胎数和死胎数;测量记录胎盘重量、胎鼠重量、胎鼠体长。计算并统计胎鼠 IU-GR 比率,以正常对照组胎鼠平均出生体重减去该组标准差的 2 倍为基准,胎鼠重量小于或等于此标准者评定为 IUGR^[15]。取 13.5 dpc 胎鼠肝脏组织,每一窝胎鼠的组织放入同一个冻存管中,液氮速冻,-80℃ 冰箱保存。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 称取 13.5 dpc 小鼠胚胎肝脏组织 20

mg, 每组各 6 个标本,采用离心柱法提取总 RNA,Nanodrop 1000 分光光度计测总 RNA 浓度。采用 Real-time PCR 法检测肝脏组织中 IGF I、IGF I R、IGF-II、IGF-II R、IGFBP-1 和 IGF-BP-3 mRNA 的水平,引物序列见表 2。Real-time PCR 反应体系 20 μ L,扩增反应条件为:50℃ 20 s,95℃ 10 min 后,以 95℃ 15 s,60℃ 1 min 循环 40 次,每份样本做三个重复孔。采用与内参基因 Gapdh 比较的 $\Delta\Delta$ CT 法计算 IGF mRNA 的相对表达量。

表 2 IGF 系统基因引物序列

Table 2 IGF system gene primers used

基因 Gene	上游引物 Forward primers	下游引物 Reverse primers	产物长度(bp) Product length(bp)
IGF I	5'-TATGGAGTGGGAAAAGCAAGA-3'	5'-GAAAAGTGGGACCCGAGAG-3'	150
IGF I R	5'-CTGATGTCTGGTCCTTCGGG-3'	5'-CACCTCCATGACGAAACGA-3'	108
IGF-II	5'-CACATTCGGCCTCTGCGAC-3'	5'-GATCCCCATTGGTACCTGGAAG-3'	143
IGF-II R	5'-TGTCAAGTGACTGACCCAGC-3'	5'-AGTGCTCCTCTTCCCGTAT-3'	109
IGFBP-1	5'-CAGCAAACAGTGTGAGACATCC-3'	5'-GTTGGGGTCCCTCTAGTCT-3'	112
IGFBP-3	5'-CTACTTGGGAACTGTGGGAGAG-3'	5'-GCACCATTATTTGCGACATCT-3'	201
Gapdh	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'	5'-CCTGCTTACCACCTTCTTGA-3'	77

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件,数据以 $\pm$ SEM 表示,组间计量资料的比较采用独立样本 t 检验,吸收胎与死胎的比率、IUGR 发生率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组雌鼠体重的变化

随机分组的两组雌鼠的初始体重没有统计学差异 ($P >$

0.05),在分别饲以相应饲料后,与正常对照组相比,叶酸缺乏组雌鼠合笼前四周体重每日的增长量降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而孕后至取材时的雌鼠体重每日的增长量两组间没有差别 ($P > 0.05$)(表 3)。

2.2 两组孕鼠吸收胎和死胎发生率的比较

在 13.5 dpc 取材时叶酸缺乏组的胎鼠总数为 51 只,其中吸收胎 14 例;正常对照组的胎鼠总数为 54 只,其中吸收胎 3 例,死胎 3 例;与对照组相比,叶酸缺乏组吸收胎和死胎率升高

表 3 两组雌鼠体重变化($\bar{X} \pm SE$)Table 3 The changes of body weight in maternal mice ($\bar{X} \pm SE$)

组别 Group	孕鼠数 Number Pregnant	初始体重(g) Initial body weight	体重每日增长量(mg/d) Increase of body weight (mg/d)	
			孕前膳食干预四周 4 weeks Before mating	孕后 1-13.5 天 Pregnancy 1-13.5d
叶酸缺乏组 FD	6	20.45 $\pm$ 0.21	17.86 $\pm$ 13.33	461.73 $\pm$ 38.19
正常对照组 Control	6	20.05 $\pm$ 0.34	57.74 $\pm$ 5.93	458.02 $\pm$ 22.74
P 值 P value		> 0.05	< 0.05	> 0.05

表 4 两组孕鼠吸收胎和死胎发生率的比较($\bar{X} \pm SE$)Table 4 The absorbed and dead fetus rate in pregnant mice ($\bar{X} \pm SE$)

组别 Group	孕鼠数 Number Pregnant	胚胎总数 Number Implanted	吸收胎数 Number Absorbed fetus	死胎数 Number dead fetus	吸收胎 + 死胎 Absorbed and dead fetus	
					例数 Number	百分率(%) Percentage
叶酸缺乏组 FD	6	51	14	0	14	27.45
正常对照组 Control	6	54	3	3	6	11.11
P 值 P value						< 0.05

1.47 倍, χ^2 检验结果显示, 两组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 4)。

表 5 两组孕鼠胎盘重量、胎鼠重量、顶臀长及 IUGR 发生率的比较 ($\bar{X} \pm SE$)

Table 5 The placenta weight, fetal weight, Crown-rump length, and IUGR rate of pregnant mice ($\bar{X} \pm SE$)

组别 Group	活胎总数 Number alive	胎盘重(mg) Placenta weight	胎重(mg) Fetal weight	顶臀长(mm) Crown-rump length	IUGR 发生率	
					IUGR rate	
					例数 Number	百分率(%) Percentage
叶酸缺乏组 FD	37	82.31 $\pm$ 2.93	105.78 $\pm$ 2.51	10.01 $\pm$ 0.11	13	35.14
正常对照组 Control	48	84.96 $\pm$ 2.94	142.82 $\pm$ 3.07	10.23 $\pm$ 0.24	0	0
P 值 P value		> 0.05	< 0.01	> 0.05		< 0.001



图 1 13.5 dpc 小鼠胚胎形态对比图

左侧: 正常对照组小鼠胚胎; 右侧: 叶酸缺乏组小鼠胚胎; 标尺 1 mm

Fig.1 Morphological comparison of 13.5 dpc fetus

Left: Control fetus; Right: FD fetus; Bar=1 mm.

2.3 胚胎发育评价及 IUGR 发生率的比较

两组孕鼠(每组 6 只)解剖结果发现, 叶酸缺乏组有 37 例活胎, 正常对照组有 48 例活胎, 图 1 为两组间胎鼠的形态对比图, 可见叶酸缺乏组胎鼠体型偏小。与对照组相比, 叶酸缺乏组平均胎鼠重量显著降低, 是正常对照组胎鼠重量的 74.06 %, 差异具有显著性 ($P < 0.01$)。计算统计两组间胚胎 IUGR 的发生率, 分析发现叶酸缺乏组显著高于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。胎盘重量和胎鼠顶臀长分析结果显示叶酸缺乏组略低于正常组, 但没有统计学差异 ($P > 0.05$) (表 5)。

2.4 胎鼠肝脏 IGF 系统基因相对表达量变化

胎鼠肝脏标本中 IGF 系统 mRNA 的相对表达水平分析结果显示, 叶酸缺乏组 IGF-II 和 IGF-II R mRNA 水平均低于正常对照组, 分别降低 58.45 % 和 32.64 %, 且两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 相反, IGF I、IGF I R、IGFBP-1 和 IGFBP-3 的 mRNA 相对表达水平, 两组间没有统计学差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 叶酸缺乏与胚胎发育

叶酸作为一种水溶性维生素, 参与 DNA 的合成与甲基化,

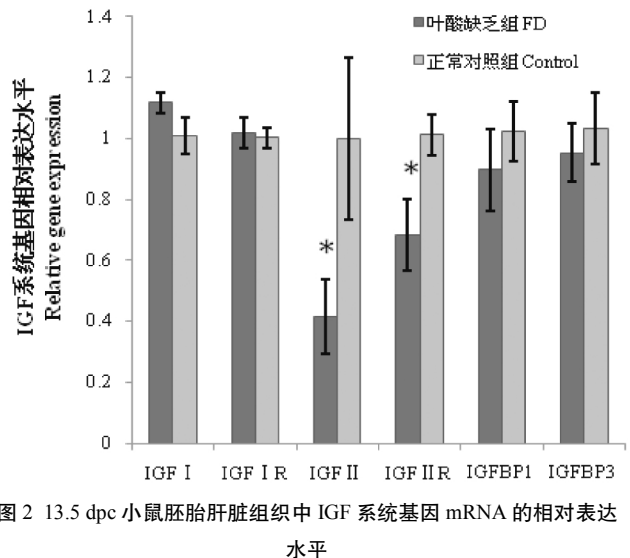


图 2 13.5 dpc 小鼠胚胎肝脏组织中 IGF 系统基因 mRNA 的相对表达水平

* $P < 0.05$, 叶酸缺乏组 VS 正常对照组

Fig.2 The relative mRNA expression of IGF system genes in hepatic tissue of 13.5 dpc fetus

* $P < 0.05$, FD VS Control

对细胞的生长至关重要, 近年来很多文献报道发现叶酸和胎儿发育关系密切。Sram RJ^[16]和 Relton CL 等人^[17]发现在早期妊娠的孕妇和新生儿中, 有吸烟习惯的孕妇叶酸水平降低, 且新生儿体重普遍偏低, 两者高度相关。巴基斯坦的 Lindblad B^[1]发现 IUGR 组母血和脐血中叶酸的水平是正常对照组的一半; 澳大利亚的 Furness D 学者^[18]发现妊娠 18-20 周、发生 IUGR 的孕妇中, 红细胞叶酸水平低于对照组, 同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 高于对照组, 并且在淋巴细胞可见 DNA 损伤的标志 - 微核和核质桥现象增多, 这表明在妊娠中期母体的低叶酸和高 Hcy 水平与 IUGR 相关。印度的 Gadhok AK^[19]通过采集妊娠晚期 150 名 IUGR 和 30 名正常孕妇的血样, 比较 Hcy、叶酸和 VB12 的水平, 发现 IUGR 组孕妇血清 Hcy 的浓度高于对照组, 而叶酸和 VB12 的浓度低于对照组。国内的蔡卫华^[20]分别研究了不同孕期的 IUGR 孕妇, 发现 IUGR 组各孕期红细胞叶酸水平平均低于对照组, 且新生儿体重与母血红细胞叶酸水平密切相关。综上所述, 妊娠早期、中期、晚期孕妇自身的低叶酸水平都会导致新生儿 IUGR 的发生率上升。

叶酸缺乏动物研究结果也发现, 低叶酸饮食母鼠的怀孕率降低, 孕鼠的孕期体重增加减少, 孕鼠宫内活胎数减少, 吸收

胎、死胎比率增加,胎鼠重量下降,而大部分活胎的大体形态学都显示正常^[2,3,21,22]。Xiao S 等^[2]建立的叶酸缺乏模型是在饲料中添加 0.033 mg/kg、0.066 mg/kg、0.132 mg/kg 等不同含量的叶酸,并且加入 1% 的琥珀磺胺噻唑(ss)以抑制肠道叶酸的合成,膳食干预 8 周后合笼。Heid、Burgoon 等建立模型的方法与前者类似,不同的是在小鼠合笼前分别膳食干预 5 周^[21]和 4 周^[22]。本实验中叶酸缺乏组小鼠采用剔除叶酸的饲料配方,以控制外源性叶酸的摄入;并且为了最大程度地模拟孕妇在围孕期的低叶酸状态,并且便于独立评价叶酸缺乏对胚胎发育的不良作用,本实验并未采用 ss 肠道抑制剂,以排除其对胚胎发育的潜在影响。小鼠胚胎的器官形成期为第 10-14 天,因此我们选择 13.5 dpc 器官形成的末期来观察叶酸缺乏对中孕期胚胎发育的影响。Bills N.D.等^[14]曾采用此方法成功建立了叶酸缺乏的小鼠模型,干预 5 周后发现小鼠体重、肝脏和红细胞等的叶酸含量都明显下降。廖国仪等人^[9]也采用类似方法建立了叶酸缺乏的孕鼠模型,通过孕前干预 2 周,发现孕晚期(E20 d)胎鼠的平均体重、鼻-臀长、脑重均低于对照组。本实验中雌鼠妊娠结局与上述文献结果一致,叶酸缺乏组雌鼠合笼前体重增长下降,孕鼠中吸收胎和死胎比率升高,胎鼠重量低于正常对照组,这说明在小鼠的孕中期,叶酸缺乏引起的胎鼠发育受限就已经得到了体现。以往实验虽表明叶酸缺乏会导致胎鼠重量下降,但均未严格的采用 IUGR 判定标准计算比率,本实验采用标准差法首次描述并判定了叶酸缺乏致小鼠胚胎 IUGR 的发生率。

3.2 IGF 表达与 IUGR

IGF 系统包括两种配体(IGF-I, IGF-II),两种受体(IGF-I R, IGF-II R)、六种 IGF 结合蛋白(IGF-binding proteins, IGFBPs)、IGFBP 相关蛋白(IGFBP-related proteins, IGFBP-rPs)和一组 IGFBP 蛋白酶^[23]。IGFs 在局部组织环境中通过自分泌和(或)旁分泌机制,配体和受体相结合,激活下游效应因子,发挥促有丝分裂作用,并可诱导细胞分化和促进许多细胞分化后功能表达。IGFBPs 是与 IGF-I、IGF-II 有高结合力的一组蛋白,循环中 IGFs 的浓度随着 IGFBPs 的变化而变化,它们是 IGFs 生物功能的调节剂,能将 IGFs 转运并定位到特定的细胞中,延长循环中 IGFs 的半衰期以调控其促生长活性,其中 IGFBP-3 在血中的含量最高,是 IGFs 的主要载体蛋白,IGFBP-1 也能快速调节血浆中 IGFs 的活性,并可在细胞水平上调节 IGFs 的物质^[10]。研究表明,IGFs 是调节胎儿生长发育的重要物质之一,亦是控制胎儿生长有效的有丝分裂素^[24]。由于肝脏是动物中叶酸存储和代谢的主要器官^[25],也是产生 IGFs 的主要器官,所以我们选取胎鼠肝脏标本为研究对象,探讨 IGF 系统基因的表达变化。

IGF-II 是重要的胚胎期生长因子,可在胎盘中调控糖原合成及合成细胞的量^[26],是调节葡萄糖转运的主要因子。IGF-II 不但可以促进细胞的增殖、分化、成熟,还可抑制细胞的凋亡;它可以介导生长激素的大部分作用,可促进机体的生长和合成代谢,并有调节免疫、降低血糖等作用,它还在肌肉和脂肪组织中具有胰岛素样作用,可通过和胰岛素 A 型受体高亲和性的结合从而发生细胞丝裂效应^[27]。IGFs 的生物学功能需要通过特异性的 IGF-受体介导完成,IGF-I R、IGF-II R 两种受体分别与各自的配体以高亲和力结合,只存在 10% 的交叉配体^[28]。IGF-

II R 是一种分布于细胞胞质和高尔基体上的跨膜糖蛋白,它在处于活跃增殖期的胚胎肝脏细胞内呈现高表达状态。自分泌生长刺激机制是肝癌细胞恶性增殖的重要原因,而 IGF-II 与 IGF-II R 的过量表达可能是其中一个分子基础^[29]。在本实验中叶酸缺乏组 13.5 dpc 胎鼠肝脏中 IGF-II、IGF-II R 的表达量均低于正常对照组,说明两者可能存在协同作用。Calvo MT 等^[30]研究证实,IUGR 胎儿 IGF 基因表达明显受抑制。多项国内研究,通过对比分析 IUGR 孕妇和正常孕妇在孕中期及分娩时羊水、母血、脐血中 IGF 系统的表达,发现无论在孕中期还是分娩时,IUGR 组脐血或羊水中 IGF-II 水平都较对照组显著降低^[31-33]。动物研究发现,IGF-II 基因敲除鼠显示出明显的 IUGR 及胎盘缩小,虽生后可显示近似正常的生长速率,但实际体重、身长仍低于正常对照鼠,同时敲除 IGF-I 及 IGF-II 基因鼠显示严重 IUGR,所有鼠生后均死于呼吸衰竭^[34]。另外,Lassarre 等^[35]发现,IGF-II 基因过度表达,胎儿体重及生长发育速度明显增加。以上实验结果证实了 IGF-II 和 IGF-II R 在胎儿生长发育中的重要作用,与 IUGR 密切相关。

3.3 叶酸缺乏与 IGF

Santos MI^[11]研究过叶酸缺乏与 TGF- β 1 和 IGF-I 表达量之间的关系,发现叶酸缺乏组母鼠血清和胎鼠颅骨中 TGF- β 1 和 IGF-I 的表达量都比对照组低;近期 Kim HW^[12]的研究表明父体叶酸缺乏会导致子代胎鼠脑部整体甲基化降低,并使 IGF-II 蛋白表达量下降。研究提示叶酸缺乏会影响 IGF 系统中相关基因的表达,而在本实验建立的叶酸缺乏小鼠模型中,胎鼠肝脏组织 IGF-II 和 IGF-II R 的表达量也发生了类似下降。由于叶酸为蛋氨酸合成所必需,而蛋氨酸的代谢中间物 S-腺苷蛋氨酸在甲基转移酶的作用下转变为 S-腺苷同型半胱氨酸的过程为体内广泛存在的甲基化反应提供甲基,而 DNA 的甲基化是调控基因表达的重要形式。有研究表明,IGF-II 基因的差异性甲基化区(DMR)去甲基化状态使其能与增强子阻遏蛋白(CTCF)结合,CTCF 能阻断增强子对 IGF-II 基因启动子的作用,使 IGF-II 不能有效地转录,进而降低 IGF-II 基因的表达^[36]。在本实验中,IGF-II 表达水平的降低,可能是由于母鼠的叶酸缺乏状态影响 IGF-II 基因 DMR 区的甲基化程度引起的。由于体内循环中 IGF 因子减少,可能无法满足细胞生长的正常生理需要,进而影响胚胎的生长发育。

综上所述,本文通过建立围孕期叶酸缺乏的小鼠模型,研究了母鼠叶酸缺乏对胎鼠发育和肝脏 IGF 系统基因表达的影响,结果表明叶酸缺乏会引起孕中期小鼠 IUGR 率增高且降低 13.5 dpc 胎鼠肝脏内 IGF-II 和 IGF-II R 的表达水平。研究结果提示,叶酸缺乏对 IGF 系统基因的调控,可能参与到胎鼠 IUGR 率增高的机制之中。胎儿的生长是多因素共同作用的,本文对与胚胎发育关系较密切的部分 IGF 基因进行了测定,除 IGF-II 和 IGF-II R 的表达量发生变化外,其他基因未发生变化。在后续研究中,将扩大样本量,检测组织叶酸浓度,并对 IGF 基因的甲基化程度进行测定,进一步探讨叶酸缺乏改变 IGF 基因表达、影响胚胎发育的机制。

参考文献(References)

- [1] Lindblad B, S Zaman, A Malik, et al. Folate, vitamin B12, and homocysteine levels in South Asian women with growth-retarded fetuses [J].

- Acta Obstet Gynecol Scand, 2005, 84(11): 1055-1061
- [2] Xiao S, DK Hansen, ET Horsley, et al. Maternal folate deficiency results in selective upregulation of folate receptors and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-E1 associated with multiple subtle aberrations in fetal tissues [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2005, 73(1): 6-28
 - [3] 杨慧敏, 孙轶, 周天鸿, 等. 叶酸缺乏孕鼠子代脑组织 DNA 甲基化变化 [J]. 营养学报, 2004, 26(3): 187-191
Yang Hui-min, Sun Yi, Zhou Tian-hong, et al. Effects of maternal folate deficiency on DNA methylation [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2004, 26(3): 187-191
 - [4] Malamitsi-Puchner A, DD Briana, D Gourgiotis, et al. Insulin-like growth factor (IGF)-I and insulin in normal and growth-restricted mother/infant pairs [J]. Mediators Inflamm, 2007, 2007: 426-446
 - [5] Dunger DB, ML Ahmed, KK Ong. Early and late weight gain and the timing of puberty [J]. Mol Cell Endocrinol, 2006, 254-255: 140-145
 - [6] Thamotharan M, BC Shin, DT Suddirikk, et al. GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 288(5): E935-947
 - [7] 黄璐, 沈宗姬. 胎儿生长受限与印痕现象研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2008, 35(6): 401-405
Huang Lu, Shen Zong-ji. The progress about Fetal Growth Restriction and the imprinting phenomenon[J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology, 2008, 35(6): 401-405
 - [8] Kanaka-Gantenbein C, G Mastorakos, GP Chrousos. Endocrine-related causes and consequences of intrauterine growth retardation [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 997: 150-157
 - [9] 张建军, 曾艳. 胎儿生长受限(FGR)研究进展 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2008(10): 129-130
Zhang Jian-jun, Zeng Yan. Research Progress about Fetal Growth Restriction (FGR)[J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2008 (10): 129-130
 - [10] 张琼, 张知新. 胰岛素样生长因子系统对生长迟缓的影响机制 [J]. 中国医学科学院学报, 2011, 33(1): 18-21
Zhang Qiong, Zhang Zhi-xin. Research Progress on the Influence Mechanism of Insulin-like Growth Factors System on Growth Restriction[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2011, 33(1): 18-21
 - [11] Santoso MI, MS Rohman. Decreased TGF-beta1 and IGF-I protein expression in rat embryo skull bone in folic acid-restricted diet [J]. J Nutr Biochem, 2006, 17(1): 51-56
 - [12] Kim HW, KN Kim, YJ Choi, et al. Effects of paternal folate deficiency on the expression of insulin-like growth factor-2 and global DNA methylation in the fetal brain [J]. Mol Nutr Food Res, 2013, 57(4): 671-676
 - [13] Reeves PG, FH Nielsen, GC Fahey Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. J Nutr, 1993, 123(11): 1939-1951
 - [14] Bills ND, MJ Koury, AJ Clifford, et al. Ineffective hematopoiesis in folate-deficient mice[J]. Blood, 1992, 79(9): 2273-2280
 - [15] 张瑞, 苟文丽, 孙云萍. 建立胎儿生长受限动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(1): 71-75
 - Zhang Rui, Gou Wen-li, Sun Yun-ping. Animal Models of Fetal Growth Restriction[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2009, 17(1): 71-75
 - [16] Sram RJ, B Binkova, Z Lnenickova, et al. The impact of plasma folate levels of mothers and newborns on intrauterine growth retardation and birth weight[J]. Mutat Res, 2005, 591(1-2): 302-310
 - [17] Relton CL, MS Pearce, L Parker. The influence of erythrocyte folate and serum vitamin B12 status on birth weight[J]. Br J Nutr, 2005, 93 (5): 593-599
 - [18] Furness D, M Fenech, G Dekker, et al. Folate, Vitamin B12, Vitamin B6 and homocysteine: impact on pregnancy outcome [J]. Matern Child Nutr, 2013, 9(2): 155-166
 - [19] Gadhok AK, M Sinha, R Khunteta, et al. Serum homocysteine level and its association with folic acid and vitamin B12 in the third trimester of pregnancies complicated with intrauterine growth restriction [J]. Clin Lab, 2011, 57(11-12): 933-938
 - [20] 蔡卫华, 张国华, 岑赛宁. 胎儿生长受限与孕妇红细胞叶酸缺乏的相关性研究 [J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(9): 1243-1244
Cai Wei-hua, Zhang Guo-hua, Cen Sai-ning. The relationship between Fetal Growth Restriction and erythrocyte folate deficiency in pregnant women [J]. Maternal and Child Health Care of China, 2008, 23 (9): 1243-1244
 - [21] Heid MK, ND Bills, SH Hinrichs, et al. Folate deficiency alone does not produce neural tube defects in mice[J]. J Nutr, 1992, 122(4): 888-894
 - [22] Burgoon JM, J Selhub, M Nadeau, et al. Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model[J]. Teratology, 2002, 65(5): 219-227
 - [23] Randhawa R, P Cohen. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth[J]. Mol Genet Metab, 2005, 86(1-2): 84-90
 - [24] Philipps AF, B Dvorak, PJ Kling, et al. Absorption of milk-borne insulin-like growth factor-I into portal blood of suckling rats [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000, 31(2): 128-135
 - [25] Lan W, J Guhaniyogi, MJ Horn, et al. A density-based proteomics sample fractionation technology: folate deficiency induced oxidative stress response in liver and brain [J]. J Biomol Tech, 2007, 18(4): 213-225
 - [26] Antonazzo P, G Alvino, V Cozzi, et al. Placental IGF2 expression in normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancies[J]. Placenta, 2008, 29(1): 99-101
 - [27] 赵霞, 张燕. 胰岛素样生长因子系统与胎儿生长发育的关系 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2011(03): 116-118
Zhao Xia, Zhang Yan. The relationship between Insulin-like growth factor system and fetus growth and development[J]. 2011(03): 116-118
 - [28] Lopez MF, P Dikkes, D Zurakowski, et al. Regulation of hepatic glycogen in the insulin-like growth factor II-deficient mouse[J]. Endocrinology, 1999, 140(3): 1442-1448
 - [29] Zhou Xiao-mei, Gu Jian-ren, Chen Yuan-qing, et al. Simultaneous Over-Expression Of Insulin-like Growth Factor-II (IGF-II) And IGF-II Receptor(IGF-II R) Genes In Human Primary Cancer-Implicat-

- ion Of Autocrine And Paracrine Mechanism In Autonomous Growth of Hepatic Cancer [J]. Chinese Journal of Cancer Research, 1992, (03): 13-17
- [30] Calvo MT, A Romo, JJ Gutierrez, et al. Study of genetic expression of intrauterine growth factors IGF-I and EGFR in placental tissue from pregnancies with intrauterine growth retardation [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2004, 17 Suppl 3: 445-450
- [31] 郭颖, 张玉洁, 康佳丽. 胰岛素生长因子 I、II 及其结合蛋白 3 在胎儿生长受限中的作用[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(4): 572-575
Guo Ying, Zhang Yu-jie, Kang Jia-li. The role of insulin-like growth factor- I and II and insulin-like growth factor binding protein-3 play in the fetal growth restriction [J]. The Journal of Practical Medicine, 2012, 28(4): 572-575
- [32] 程雪君. 胰岛素样生长因子 -1、2 与胎儿生长受限的相关性 [J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(15): 2296-2297
Cheng Xue-jun. Study on the relationship between IGF-1,2 and fetal growth retardation[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2011, 26(15): 2296-2297
- [33] 顾孔珍, 王晓春. 胎儿生长受限与胰岛素样生长因子及其结合蛋白关系的研究[J]. 实用预防医学, 2007, 14(3): 883-884
Gu Kong-zhen, Wang Xiao-chun. Relationship Between Fetal Growth Restriction and Insulin-like Growth Factor and Insulin-like Growth Factor Binding Protein[J]. Practical Preventive Medicine, 2007, 14(3): 883-884
- [34] Gu M, DC Pritlove, CA Boyd, et al. Placental expression of 2,3 bisphosphoglycerate mutase in IGF-II knock out mouse: correlation of circulating maternal 2,3 bisphosphoglycerate and fetal growth[J]. Placenta, 2009, 30(10): 919-922
- [35] Lassarre C, S Hardouin, F Daffos, et al. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation[J]. Pediatr Res, 1991, 29(3): 219-225
- [36] 丁建华, 蔡刚, 傅传刚, 等. H19/IGF2 基因印记调控机制研究进展 [J]. 国外医学(分子生物学分册), 2003, 25(4): 241-245
Ding Jian-hua, Cai Gang, Fu Chuan-gang, et al. Research progress about regulatory mechanism of H19/IGF2 genes imprinting [J]. Foreign Medical Sciences, 2003, 25(4): 241-245

• 重要信息 •

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001; 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN:978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。