

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.25.009

MTX 诱导神经管畸形动物模型的建立*

徐文婧¹ 关涛¹ 王建华² 季成¹ 董艳婷¹ 周楠¹ 张霆² 牛勃^{1,2,Δ}

(1 山西医科大学基础医学院 山西太原 030001; 2 首都儿科研究所儿童发育营养组学北京市重点实验室 北京 100020)

摘要 目的:通过二氢叶酸还原酶(DHFR)竞争性抑制剂甲氨蝶呤(MTX)建立叶酸缺乏的神经管畸形(NTDs)动物模型。**方法:**本研究用孕 7.5 天 C57BL/6J 小鼠,采用腹腔注射(ip)不同剂量的 MTX 建立叶酸代谢障碍的小鼠 NTDs 模型, LC/MS/MS 及酶学方法检测胚胎组织中叶酸相关代谢产物水平及 DHFR 活性。**结果:**最佳的致畸剂量为, MTX 4.5 mg/kg, 其 NTDs 发生率最高为 31.4%。畸形的胎鼠表型多数为后脑泡未闭, 且其身长(4.21±0.76), 体重(9.49±3.48)均明显低于对照组(6.32±0.56; 22.76±3.23)(P<0.05; P<0.05)。MTX 实验组的胚胎组织中 DHFR 的活性较对照组显著降低(P<0.05), 5-MeTHF 和 5-FoTHF 的浓度和对照组相比也明显降低(P<0.05)。**结论:**本研究成功的建立了叶酸缺乏的神经管畸形动物模型。

关键词:神经管畸形; 甲氨蝶呤; 叶酸缺乏

中图分类号: Q95-3; R722 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)25-4837-06

The Establishment of Folate Deficiency-related Animal Model of Neural Tube Defects by MTX*

XU Wen-jing¹, GUAN Tao¹, WANG Jian-hua², JI Cheng¹, DONG Yan-ting¹, ZHOU Nan¹, ZHANG Ting², NIU Bo^{1,2,Δ}

(1 School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi, 030001, China;

2 Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China)

ABSTRACT Objective: To establish the animal model of neural tube defects (NTDs) by folate deficiency induced dihydrofolate reductase (DHFR) inhibitor, methotrexate (MTX). **Methods:** The NTDs animal model was established by intraperitoneal injection of different doses of MTX into pregnant C57BL/6J mice on gestational day 7.5. Folate-related metabolic products and DHFR activity in embryo tissues were measured by using LC/MS/MS assay. **Results:** MTX with the dose of 4.5 mg/kg induced the highest incidence of NTDs (31.4%) and was considered as the optimal teratogenic dosage. Most NTDs exhibited the failure of hindbrain closure of the neural tube and the body length (4.21±0.76) and weight (9.49±3.48) decreased significantly compared with that in the control group (6.32±0.56 vs 22.76±3.23), (P<0.05 vs P<0.05). DHFR activity and concentrations of 5-MeTHF and 5-FoTHF were obviously lower than that in the control group after MTX treatment (P<0.05). **Conclusion:** NTDs animal model induced by folate deficiency was successfully established.

Key words: Neural tube defects; Methotrexate; Folate deficiency

Chinese Library Classification: Q95-3; R722 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)25-4837-06

前言

叶酸缺乏与神经管畸形(Neural Tube Defects, NTDs)密切相关。围孕期补充足够的叶酸可以预防 50%-70% NTDs 的发生, 但叶酸缺乏与 NTDs 的确切机制仍不清楚^[1-4]。叶酸在体内主要参与了一碳单位的代谢。叶酸代谢障碍及其相关代谢障碍, 会引起单核苷酸代谢和甲基化代谢发生紊乱, 影响 DNA 合成、损伤修复及基因组的稳定性, 继而引起细胞行为的改变, 如, 增殖分化凋亡等重要生物过程发生异常, 最终影响神经管的发育^[5-8]。利用非突变小鼠通过膳食叶酸缺乏途径建立的 NTDs 模型至今未见报道, 因为体内存在代偿机制难以控制动物体内叶酸的水平。通过阻断叶酸代谢途径中的特异性靶点,

可以造成叶酸代谢障碍^[9, 10], 本研究利用叶酸代谢关键酶(DHFR)的抑制剂(MTX)阻断叶酸到二氢叶酸和四氢叶酸的生成, 干扰了叶酸的代谢, 模拟了体内叶酸缺乏的内环境, 从而建立了叶酸缺乏的 NTDs 动物模型, 为探讨叶酸缺乏引起 NTDs 的机制提供了实验模型的基础。

1 材料与方法

1.1 动物诱导和样品

7-8 周 SPF 级饲养的 C57BL/6J 小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司, 中国), 当天晚上 18 时以 1:1 合笼过夜, 第二天早上检测到阴栓者, 计为孕 0.5 天。取孕 7.5 天小鼠, 实验组分别腹腔注射 0.5、1.0、3.0、4.5 和 6.0 mg/kg 体重 MTX(Mer-

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81070491)

作者简介: 徐文婧(1986-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 分子生物学, E-mail: xuwenjing0214@126.com

Δ 通讯作者: 牛勃, E-mail: niub2004@126.com, 电话: 0351-4135670

(收稿日期: 2013-12-20 接受日期: 2014-01-19)

ck, USA), 正常对照组腹腔注射等量生理盐水。孕 11.5 天脱颈处死, 取胚胎, 观察胚胎畸形情况。用 10% 的中性福尔马林将部分胎鼠标本固定做脑部连续切片, HE 染色。分离一窝正常胚胎的神经管组织作为正常对照样品。将获得的 NTDs 胚胎的神经管组织分离, 提取 DNA 储存 -70 °C。随后在 0、4、12、24 和 96 小时后, 分别收集最佳注射剂量的胚胎组织, 每窝汇集成一个样本观察 DHFR 活性和叶酸浓度的胚胎组织进行分析。

1.2 LC / MS / MS 检测胚胎组织叶酸及其相关代谢产物分析

采用已经建立的简单高效的 LC / MS / MS 方法对胚胎组织中叶酸及其相关代谢产物进行检测。用提取缓冲液稀释样品 (MES 0.05 mol/LMES, 0.1 mol/L DET, 1% 抗坏血酸钠, pH 6.0), 100 °C 15 min, 36,000× g 离心 15 min。37 °C 孵育 1.5 小时。将样品加热到 100 °C 5 min, 36,000× g 离心 20 min。然后将上清液储存在 -20 °C 备用。采用 Waters ACQUITY UPLCTM BEH C18 色谱柱 (2.1× 50 mm I.D., 1.7 μm waters, USA), 柱温: 40 °C, 样品室 4 °C; 进样体积为 5 μL, 流动相 A 为 0.1% (V/V) 甲酸水, 流动相 B 为乙腈。设定流速为 400 μL/min, 设定洗脱梯度为: 0-1 min, 99.9% to 99.9% A; 1-3 min 99.9% A to 82% A, 3-4 min 82% A to 10% A, 4-5 min 10% A to 10% A; 5-6 min, 10% to 99.9%。平衡时间为 1 min., 总分析时间 7 min, 注入体积为 5 ul。电喷雾离子源正离子模式 (ESI+); 多反映检测 (MRM) 方式; 毛细管电压 3000 V; 离子源温度 150 °C; 去溶剂温度 400 °C; 碰撞气流为 0.13 mL/min。锥孔气和去溶剂气体流速分别为 30, 900 L/h。

1.3 胚胎组织 DHFR 活性检测

按照试剂盒 (One Step Animal Tissue Active Protein Extraction Kit) 使用说明提取胚胎组织中的总蛋白。首先称量胚胎组织的重量, 加入适量的预冷的抽提试剂 (100 mg 组织 / 1 ml 抽提液), 转移至提前预冷的微量匀浆器中, 研磨组织, 将研磨好的组织转移至 EP 管, 12,000 rpm 4 °C 离心 10 min, 取上清。用 Bradford 法测定胚胎总蛋白浓度。建立蛋白浓度标准曲线, 在每管分别加入 Bradford 工作液 2.5 mL, 充分混匀, 于室温静置 5 min, 用 Blank 管调零, 于 595 nm 测得 A 值。多次测量, 取各点的 OD_{595 nm} 均值进行作图, 绘出标准曲线。检测样品, 将 100 μL 待测蛋白溶液转移至离心管中, 加入 2.5 mL Bradford 工作液混匀; 以 Blank 调零, 静置 5 min 后检测 OD₅₉₅ 值, 利用

已经绘制出的标准曲线的回归方程, 计算蛋白质的浓度。将仪器调至 340 nm, 22 °C, 动态程序 (每 15 s 读取一次, 共 10 次)。加 98.5 μL Assay Buffer x1 至 96 孔板中然后加入样品 1.5 μL, 混合均匀。加入 0.6 μL NADPH 溶液混匀, 测试前加入 0.5 μL Dihydrofolic acid。在 340 nm 下进行动态监测, 发现吸光度值逐渐下降, 利用公式测定 DHFR 活性。

1.4 统计分析

采用 SPSS16.0 统计软件对其结果进行分析。应用 χ^2 检验分析各组间胎鼠 NTDs 的发生率以及畸形率; 当样本数量低于 5, 采用 Fisher's 确切概率法进行比较分析。采用单因素的方差分析统计方法对各组之间小鼠胚胎发育情况, 即身长、体重进行比较分析, 所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTX 致出生缺陷的动物模型建立

本研究利用梯度剂量试验确定 MTX 剂量在 400 mg/kg, 200 mg/kg, 100 mg/kg, 25 mg/kg 小鼠胚胎的存活率为 0, 吸收胎的比率为 100%, 即 MTX 剂量 ≥ 25 mg/kg 体重, 则小鼠胚胎的致死率为 100%。MTX 剂量组为 12.5 mg/kg 和 6 mg/kg 的胎鼠的致死率没有统计学差异, 分别为 84.4% 和 86.7%, 但在 6 mg/kg 体重剂量组的畸形率为 6.7%, MTX 为 1 mg/kg 体重剂量的存活率为 80%, 吸收胎的比率较低为 13.3%, 畸形胎的比率不高为 6.7% (见表 1)。因此, 最佳建模的 MTX 剂量应在 1 mg/kg 和 6 mg/kg 之间。确定最适合剂量后用 MTX 4.5 mg/kg 体重剂量, NTDs 的发生率为 31.4%, 生长发育迟缓的发生率 40%, 其他的畸形如唇裂、颅面畸形的发生率为 8.6%, 吸收胎的发生率为 20%。不同剂量组的 MTX 对小鼠胚胎神经管发育的也有不同的影响, 通过对胎鼠身长和体重的测量, 发现随着 MTX 剂量的增加, 胎鼠的身长和体重呈下降的趋势 (表 2, 图 1), 但与正常组相比实验剂量组 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg 没有明显的统计学差异, 而剂量组 4.5 mg/kg 的胎鼠身长、体重有显著降低, 与正常对照组相比有明显的统计学 ($P < 0.01$)。为了验证实验的重复性, 重复实验 4.5 mg/kg 的致畸剂量, 结果发现批间无统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 1 建立动物模型的最佳剂量摸索情况

Table 1 The results of optimum dose for the establishment of NTD model

MTX (mg/kg)	Litters 窝数(n)	Embryos 胚胎(n)	Normal 正常胚胎 n (%)	Resorption 吸收胎 n (%)	Growth retardation 发育迟缓 n (%)	NTDs 神经管畸形 n (%)	Other malformation 其他畸形 n (%)
0	8	66	65(98.1)	1(1.9)	0(0)	0(0)	0(0)
0.5	8	52	49(94.2)	2(3.8)	0(0)	0(0)	1§ (1.9)
1	4	30	24(80.0)	4(13.3)	1(3.3)	1(3.3)	0(0)
3	6	35	16(45.7)	10(28.6)	4(11.4)	2(5.7)	3§ (8.6)
4.5	5	35	0(0)	7(20)	14(40.0)	11(31.4)	2&; 1§ (8.6)
6	4	33	0(0)	26(86.7)	3(9.1)	0(0)	1&(3.0)

Note: *: Facial malformation; 面部畸形

§ : Craniofacial malformation; 颅面畸形

& : Cleft lip 唇裂

表 2 MTX 对胚胎生长发育状态的影响
Table 2 The effects of MTX on development of embryos

MTX (mg/kg)	Embryos 胎数(n)	Length 体长 (mm)	Weight 体重 (mg)
0	29	6.32± 0.56	22.76± 3.23
0.5	32	6.58± 0.67	21.37± 4.52
1	30	6.13± 0.38	20.54± 3.13
3	35	5.76± 1.37	18.63± 5.75
4.5	35	4.21± 0.76**	9.49± 3.48**
6	NA	NA	NA

Note: **P 0.01 compared with MTX 0 mg/kg group.

表 3 MTX4.5 mg/kg 诱导 NTD 重复实验结果
Table 3 The results of repeated experiments of NTD model establishment

Batch 批次	Pregnant rats 孕鼠(n)	Embryos 胎数(n)	Normal 正常胎 n (%)	Resorption 吸收胎 n (%)	NTDs n (%)	Other malformation 其他畸形 n (%)	P-value
1	5	35	0(0)	7(20)	8(31.4)	1 [§] ; 19 [#] (57.1)	>0.05
2	4	32	1(3.1)	3(9.4)	8(25.0)	20 [#] (62.5)	
3	4	30	0(0)	7(23.3)	8(26.7)	1 [§] ; 14 [#] (50.0)	

Note: *, Facial malformation;面部畸形; #, growth retardation;发育迟缓; § :craniofacial malformation, 颜面部畸形

2.2 MTX 引起胚胎发育异常

观察胎鼠的大体情况,在体视显微镜下观察胎鼠的发育情况(如图 1)。孕 11.5 天的正常胎鼠(图 1A)整体外观饱满圆润,而其头部的前、中、后脑泡均完整,可见明显的耳泡、眼泡,脊柱的表面完整,神经管闭合完全,其尾部弯曲细长。而畸形胎鼠都有不同程度的发育迟缓,表现为身长和体重均降低,发育迟滞,

通过身长体重外观等观察,仅相当于孕 10.5 天左右胎鼠的发育状态。在 NTDs 的胎鼠中,发生率最高的是神经管未闭合(后脑畸形)(图 1B),可见少数的神经管未闭合(全脑畸形)(图 1C)和神经管未闭合(从脑至脊柱畸形)(图 1D)。并且还观察到了其他畸形,颜面部的畸形(图 1E)和唇裂畸形。发育障碍中发生率最高的表型是发育迟缓的胚胎,从它们的外表看不到任何

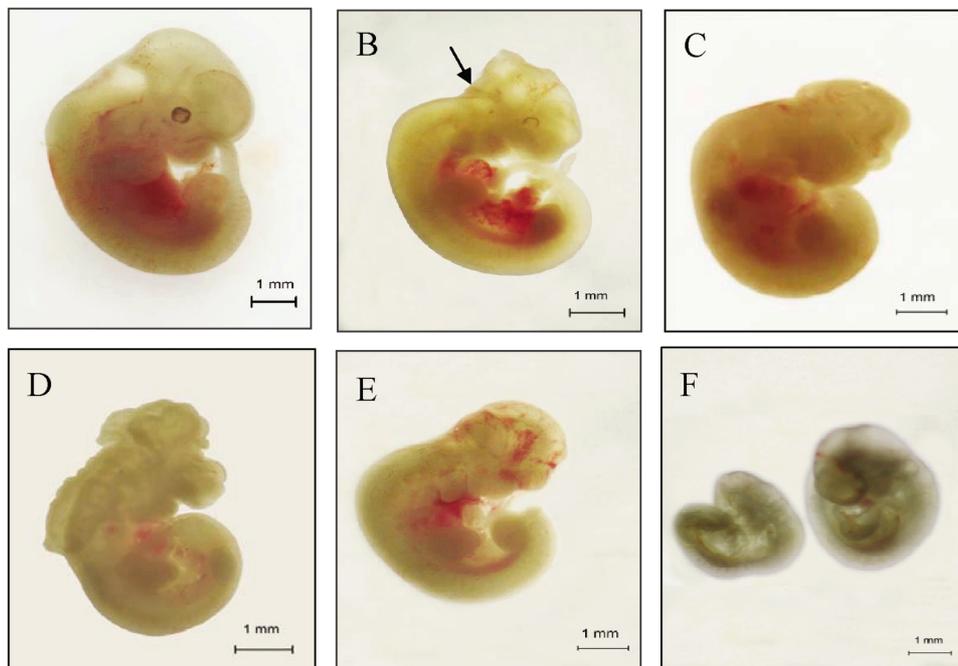


图 1 MTX 引起的正常和发育异常胚胎

A 图为正常的胚胎;B 图为神经管未闭畸形(后脑畸形);C 图为神经管未闭畸形(全脑畸形);D 图为神经管未闭畸形(脑至脊柱畸形);E 图为颜面部的畸形;F 图为发育迟缓的畸形。

Fig.1 Morphological changes of normal and abnormal embryos on gestational day 11.5

A, normal embryo; B neural tube disclosure (hindbrain malformations); C, neural tube disclosure (the whole brain malformations); D, neural tube disclosure (malformations from cranial to the spinal region); E, craniofacial malformation; F, growth retardation.

的畸形(图 1F)。

2.3 MTX 引起胚胎神经管发育异常的病理改变

进一步观察 MTX 对神经上皮细胞发育的影响,在低倍镜(50×)下,可以看到对照组胎鼠的神经管发育良好,神经管腔大小规则,神经上皮内、外界膜排列平整,NT 周围间充质细胞排布均匀并且密集(图 2Ac、Bc)。露脑畸形胎鼠的端脑泡虽然已经发育形成,但其神经管腔面内外界膜排列不平整,并且管腔壁厚薄不一;后脑的顶板并未融合,只被一层间质和羊膜包

裹(图 2,Ad、Bd)。在 200× 放大倍数下,可以观察到正常的神经上皮细胞排列平整而且紧密,而在室管膜层可见正处于分裂相的神经上皮细胞。NTD 的神经上皮的细胞排列较不整齐和疏松,细胞核较小,在室管膜层却很少看到正处于分裂相的细胞,这些病理的变化在前脑部分表现尤为明显。在高倍镜(400×)下,可以看到正常的胎鼠的神经管的室管膜边缘整齐,未见脱落的细胞,而 NTD 神经上皮的室管膜边缘不整齐,在端脑处可见部分的细胞核已经发生溶解。

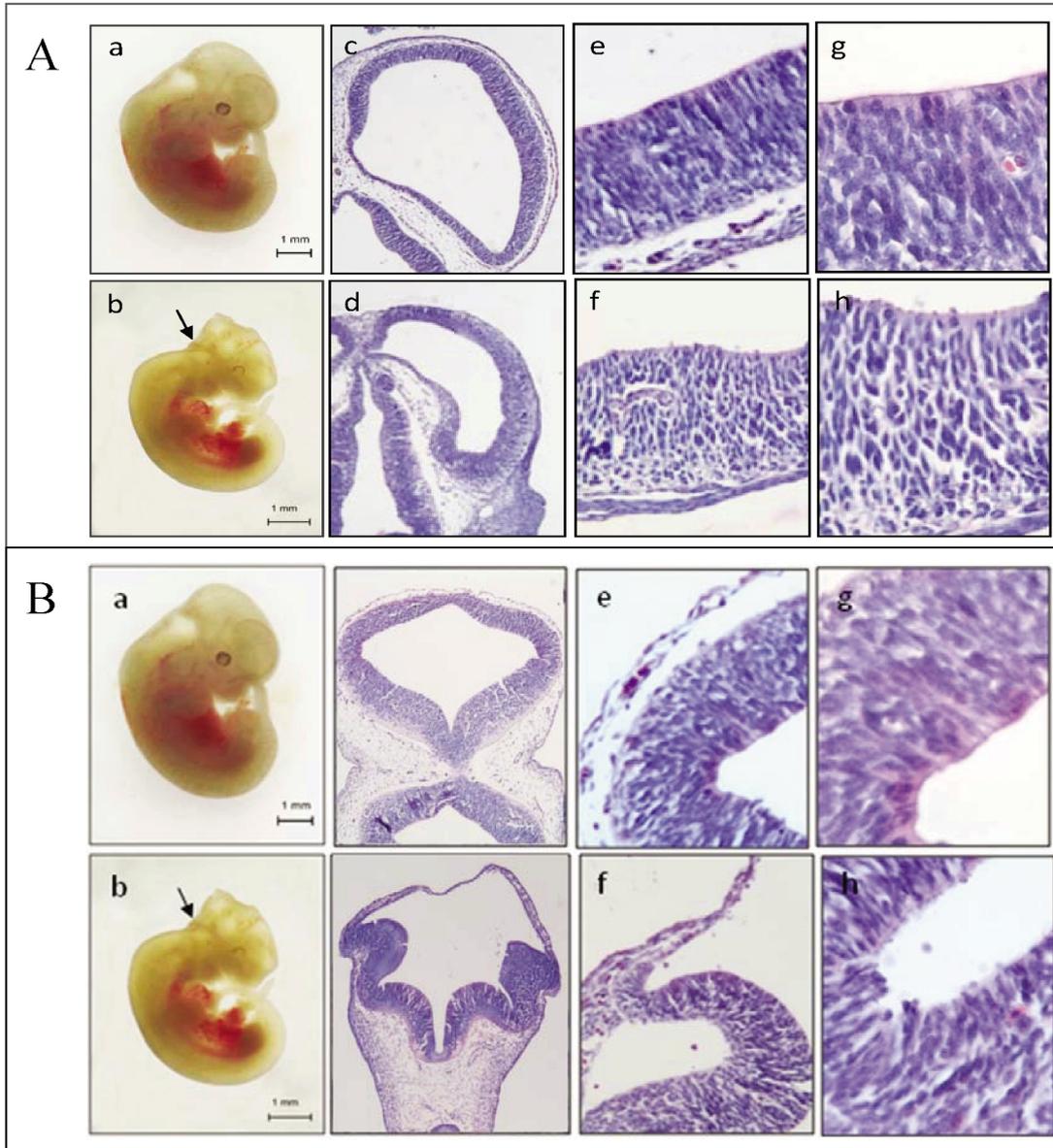


图 2 正常和 NTD 小鼠胚胎的神经管 HE 染色

A 图为正常和 NTD 小鼠胚胎端脑病理结果;B 图为正常和 NTD 小鼠胚胎后脑病理结果。从左至右放大倍数分别为 50×、200×、400×

Fig.2 HE staining of normal and NTD embryonic neural tube

A shows HE staining results of telencephalon from normal and NTDs murine embryos; B shows HE staining results of hindbrain from normal and NTDs murine embryos. Magnified by 50×, 200×, 400× from left to right, respectively.

2.4 MTX 对胚胎叶酸相关代谢的影响

MTX 干扰了叶酸的代谢,因而检测叶酸代谢通路的生化指标,是否异常。在注射 MTX 试剂后的 4 h、12 h 及 96 h 分别检测实验组、对照组的胚胎组织中的 DHFR 活性。与对照组相比,注射 MTX 4h 后 DHFR 活性显著降低(P<0.01),而 96 h 后

DHFR 活性仍低于正常对照组(P<0.05)(如图 3A)。同时,用 LC/MS/MS 方法检测叶酸相关代谢产物的浓度。不同时间点注射 MTX 后,胚胎组织中的总叶酸(total folate)浓度、5-MeTHF 的浓度和 5-FoTHF 的浓度显著下降,而叶酸的浓度明显升高(图 3B)。

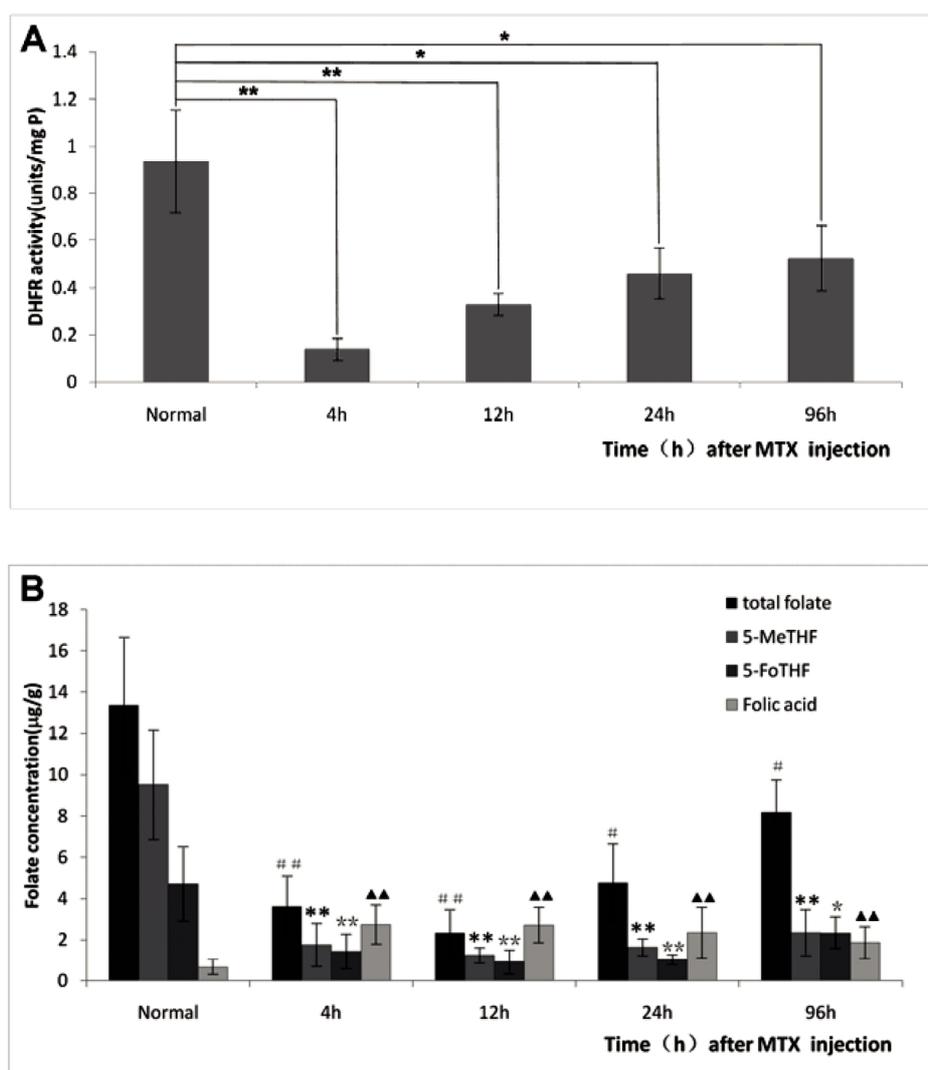


图3 叶酸相关代谢物检测结果

A 图为在注射 MTX 后不同的时间点,胎鼠组织的 DHFR 活性。B 图为注射 MTX 后,在不同的时间胎鼠组织中 total folate、5-MeTHF、5-FoTHF 和 folic acid 含量的变化。

Fig.3 The results of folate related metabolite

Figure A shows DHFR activity in murine embryonic tissues after MTX injection in various time points; figure B shows levels of total folate, 5-MeTHF, 5-FoT and folic acid in murine embryonic tissues after MTX injection in various time points.

3 讨论

叶酸在体内的生物学意义是其终产物 - 四氢叶酸(THF), 它是一碳单位的载体。一碳单位还包括甲酰基(CHO), 亚胺甲基(CH=NH), 甲基(CH₃), 次甲基(CH=), 亚甲基(CH₂-)和羟甲基的(CH₂OH), 这些一碳单位和体内重要的代谢途径是至关重要的, 特别是参与了核酸代谢和表观遗传代谢, 在单核苷酸的合成和甲基化的生物过程中是必不可少的^[7,9,11-13]。母体营养的状态是很重要的外界环境因素, 流行病学研究表明, 妊娠早期的叶酸缺乏是发生 NTDs 的重要危险因素^[3,4,12,14]。为了进一步研究 NTD 及其他出生缺陷的发病机制, 我们需要良好的动物模型, 已经报道的动物模型多数是通过多种致畸剂等非遗传因素及叶酸和叶酸代谢相关营养素的代谢途径中关键基因突变致畸的动物模型^[15-17]。直接干预叶酸代谢途径造成叶酸代谢紊乱而建立 NTDs 的动物模型尚未报道。因此, 本研究选择

叶酸代谢途径的角度, 结合小鼠神经管发育的特定时间点, 用抗叶酸代谢药 - 特异性抑制 DHFR 的药物 MTX, 引起孕鼠体内叶酸代谢的障碍, 建立了叶酸缺乏的实验动物模型, 对研究叶酸和神经管发育的作用机制提供了重要的实验模型基础。

DHFR 是叶酸代谢途径中的关键酶, 可催化叶酸还原为二氢叶酸再还原为四氢叶酸, 是叶酸在体内形成活性形式的唯一途径。MTX 是 DHFR 特异性的抑制剂, 导致二氢叶酸不能被还原成为有活性的四氢叶酸, 从而阻断了一碳单位代谢途径。一方面影响了核苷酸的代谢, 单核苷酸不仅作为合成 DNA 和 RNA 的原料, 还参与了细胞内化学能载体, 并且是细胞内信号转导信使, 还是一些辅酶的结构成分; 另一方面阻断叶酸发育过程不同时间点, 与发育相关基因的表达具有了时空特异性。而叶酸代谢紊乱干扰了甲基化的正常代谢, 导致一些关键基因表达异常, 于此同时也干扰了蛋白质和脂类的甲基化^[18-21], 并且会引起基因组不稳定性的改变, 从而导致基因水平的变化, 继

而引起细胞水平,大体水平的变化。

本研究采用 DHFR 的抑制剂 MTX,在神经管发育开始(胚胎发育 E7.5),给孕鼠腹腔注射 MTX,在神经管完全闭合的 E11.5 天解剖观察,发现随着 MTX 剂量的增加,小鼠胚胎的身长和体重都有下降的趋势,但当剂量增加到一定范围后,胚胎均为吸收胎状态。实验中的最佳剂量,4.5 mg/kg 体重组 NTDs 发生率为 31.4%,生长发育迟缓发生率为 40%,其他畸形表型如唇裂,颅面畸形发生率 8.6%,吸收胎发生率为 20%;其他剂量的畸形率均低于 4.5 mg/kg,因此我们通过剂量摸索方式,寻到了最佳的致畸剂量。通过组织化学染色,发现露脑畸形胎鼠的端脑泡虽然已分化发育,但其神经管的腔面不平整,管壁厚薄不均一,后脑顶板没有融合只是被一层羊膜和间质所包裹。而正常神经管的神经上皮细胞排列整齐紧密,在室管膜层可见处于分裂相的细胞。NTD 神经上皮细胞排列疏松,细胞核小,室管膜层很少看到处于分裂相的细胞,这种病理变化在前脑表现的尤为显著。在 E7.5-E11.5 天小鼠神经管发育的阶段,MTX 影响了神经上皮细胞的发育,影响了神经管的正常闭合。LC/MS/MS 检测发现孕鼠体内 DHFR 的活性明显降低($P < 0.05$),胚胎组织 5-MeTHF 和 5-FoTHF 有活性的一碳单位水平明显下降。说明 MTX 抑制 DHFR 的活性,导致叶酸代谢紊乱,引起一碳单位代谢异常,影响了发育过程中关键基因的表达异常,通过病理检测,发现神经上皮细胞受到影响,其可能是由于 MTX 引起了细胞的增殖,分化,凋亡异常,影响了神经上皮细胞的发育。从而引起了发育异常,尤其 NTDs,这一结果与以往人群流调研究的结果相一致,表明怀孕期间叶酸代谢紊乱与早产儿、低出生体重儿、胎儿生长迟缓和其他妊娠不良后果,特别是 NTDs、唇腭裂及其颜面部等畸形的发生密切相关。

本研究利用叶酸代谢通路的特异性抑制剂成功诱导出了 NTDs 的小鼠动物模型,通过剂量摸索,4.5 mg/kg 为最佳畸形剂量,才此造模的方法操作简单,实验的重复性好,致畸率较高而且效果稳定,致死率较低。MTX 通过竞争性的抑制二氢叶酸还原酶活性,成功的阻碍了叶酸的正常代谢,模拟出与人体叶酸缺乏造成 NTDs 的发病机制相近的动物模型,为进一步研究发育障碍,特别是 NTDs 的研究,提供了重要的实验依据和理论基础。

参考文献(References)

- [1] Shaw GM, Schaffer D, Velie EM, et al. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects [J]. *Epidemiology*, 1995, 6(3): 219-226
- [2] Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group [J]. *Lancet*, 1991, 338(8760): 131-137
- [3] Czeizel AE, Toth M, Rockenbauer M. Population-based case control study of folic acid supplementation during pregnancy [J]. *Teratology*, 1996, 53(6): 345-351
- [4] Rabiou TB, Adeleye AO. Prevention of myelomeningocele: African perspectives[J]. *Childs Nerv Syst*, 2013, 29(9): 1533-1540
- [5] Ulrich CM, Robien K, Sparks R. Pharmacogenetics and folate metabolism—a promising direction[J]. *Pharmacogenomics*, 2002, 3(3): 299-313
- [6] Duthie SJ, Narayanan S, Brand GM, et al. Impact of folate deficiency on DNA stability[J]. *J Nutr*, 2002, 132(8 Suppl): 2444S-2449S
- [7] Fox JT, Stover PJ. Folate-mediated one-carbon metabolism[J]. *Vitam Horm*, 2008, 79: 1-44
- [8] Knock E, Deng L, Wu Q, et al. Strain differences in mice highlight the role of DNA damage in neoplasia induced by low dietary folate [J]. *J Nutr*, 2008, 138(4): 653-658
- [9] Panetta JC, Paugh SW, Evans WE. Mathematical modeling of folate metabolism[J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2013, 5(5): 603-613
- [10] Hagner N, Joerger M. Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis[J]. *Cancer Manag Res*, 2010, 2: 293-301
- [11] Osterhues A, Ali NS, Michels KB. The role of folic acid fortification in neural tube defects: a review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2013, 53(11): 1180-1190
- [12] Seremak-Mrozikiewicz A. The significance of folate metabolism in complications of pregnant women [J]. *Ginekol Pol*, 2013, 84(5): 377-384
- [13] Stover PJ. One-carbon metabolism-genome interactions in folate-associated pathologies[J]. *J Nutr*, 2009, 139(12): 2402-2405
- [14] Gu X, Lin L, Zheng X, et al. High prevalence of NTDs in Shanxi Province: a combined epidemiological approach[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2007, 79(10): 702-707
- [15] Chen B. Loop-tail phenotype in heterozygous mice and neural tube defects in homozygous mice result from a nonsense mutation in the *Vangl2* gene[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(3): 3157-3165
- [16] Christensen KE, Mao HH, Chen L, et al. A novel mouse model for genetic variation in 10-formyltetrahydrofolate synthetase exhibits disturbed purine synthesis with impacts on pregnancy and embryonic development[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(18): 3705-3719
- [17] Knock E, Deng L, Wu Q, et al. Low dietary folate initiates intestinal tumors in mice, with altered expression of G2-M checkpoint regulators polo-like kinase 1 and cell division cycle 25c [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(21): 10349-10356
- [18] Stover PJ. Polymorphisms in 1-carbon metabolism, epigenetics and folate-related pathologies[J]. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, 2011, 4(5): 293-305
- [19] Sun S, Gui Y, Wang Y, et al. Effects of methotrexate on the developments of heart and vessel in zebrafish [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009, 41(1): 86-96
- [20] Galbiatti AL, Castro R, Caldas HC, et al. Alterations in the expression pattern of MTHFR, DHFR, TYMS, and SLC19A1 genes after treatment of laryngeal cancer cells with high and low doses of methotrexate[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(6): 3765-3771
- [21] Yoon SA, Choi JR, Kim JO, et al. Influence of reduced folate carrier and dihydrofolate reductase genes on methotrexate-induced cytotoxicity[J]. *Cancer Res Treat*, 2010, 42(3): 163-171