

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.11.002

碱基切除修复基因 *Lig3* 对小鼠胚胎神经发育的影响 *

李正莉¹ 官臻² 朱智强² 王建华^{2Δ} 王秀伟^{2Δ}

(1 首都儿科研究所附属儿童医院呼吸科 北京 100020; 2 首都儿科研究所儿童发育营养学组北京市重点实验室 北京 100020)

摘要 目的: DNA 连接酶 III(DNA ligase III, *Lig3*) 基因是碱基切除修复通路中的关键基因, 在胚胎发育过程中发挥重要作用, 通过研究 *Lig3* 基因在叶酸代谢障碍状态下的表达情况, 探讨其对小鼠胚胎神经发育的影响。**方法:** 采用无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 C57BL/6J 成年小鼠(8-9 周, 18-20 g), 雌雄 1:1 合笼, 孕鼠随机分为实验组和对照组, 孕 7.5 天实验组腹腔注射 4.5 mg/kg 体重甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX, 二氢叶酸还原酶抑制剂)诱导产生叶酸代谢障碍的小鼠神经管畸形(neural tube defects, NTDs)模型, 对照组腹腔注射等体积的生理盐水。孕 10.5 天体视显微镜下观察胎鼠的发育情况。同时利用 200 nM 的 MTX 建立叶酸代谢障碍的小鼠神经干细胞模型。在模型建立成功的基础上, 应用实时荧光定量聚合酶链反应(Real time quantitative PCR, RT-qPCR)及免疫印迹(Western blot)等方法研究碱基切除修复通路相关基因 *Lig3* 的表达水平。**结果:** 4.5 mg/kg 体重 MTX 处理孕鼠后胎鼠 NTDs 的发生率为 31.1%(19/61), 而正常对照组未见胎鼠 NTDs 的发生。在体视显微镜下可见 NTDs 胎鼠神经管未闭合, 而正常胎鼠发育完好。RT-qPCR 检测发现叶酸代谢障碍小鼠 NTDs 胚胎神经组织中 *Lig3* mRNA 的表达水平明显低于对照组($P<0.05$)。Western blot 检测发现, 与对照组相比, 叶酸代谢障碍 NTDs 胎鼠神经组织中 *Lig3* 蛋白水平明显降低($P<0.05$)。同时, 在 MTX 处理的神经干细胞中, *Lig3* 的表达水平明显低于对照组($P<0.05$)。对凋亡相关蛋白 Cleaved caspase-3 进行检测发现 MTX 处理后的 NTDs 胎鼠神经组织及细胞模型中其表达均明显增加, 表明细胞凋亡增加。**结论:** 在叶酸代谢障碍前提下, *Lig3* 表达降低, DNA 修复功能减弱, 细胞凋亡增加, 导致 NTDs 的发生, 为 NTDs 及出生缺陷的防控提供新思路。

关键词: 甲氨蝶呤; 叶酸; 神经管畸形; DNA 修复

中图分类号: Q-33; Q132.7; Q593.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)11-2008-05

Effect of Base Excision Repair-DNA ligase III on Mice Embryonic Neural Development*

LI Zheng-li¹, GUAN Zhen², ZHU Zhi-qiang², WANG Jian-hua^{2Δ}, WANG Xiu-wei^{2Δ}

(1 Respiratory department of children's Hospital Affiliated to Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China;

2 Beijing Municipal Key Laboratory of Child Development and Nutriomics, Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China)

ABSTRACT Objective: DNA ligase III (*Lig3*) gene as a key gene of the base excision repair pathway plays an important role in the process of embryonic development. Here, the study was to evaluate the effect of *Lig3* gene on the mice embryonic neural tube development in the state of folate metabolism disorder. **Methods:** C57BL / 6J adult mice (8-9 weeks, 18-20g) with specific pathogen free (SPF) were used. The pregnant mice were randomly divided into experimental group and control group, At 7.5 days of gestation, the experimental group was intraperitoneally injected with 4.5 mg/kg methotrexate (MTX, dihydrofolate reductase inhibitor) to induce the mice model of neural tube defects (NTDs) with folate metabolism disorder, and the control group was intraperitoneally injected with equal volume of normal saline. The development of fetal mice was observed under stereomicroscope on 10.5 days of gestation. At the same time, a mice neural stem cell model with folate metabolism disorder was established by using 200 nM MTX. Based on the successful establishment of the model, the expression level of base excision repair pathway related gene *Lig3* and cleaved- caspase3 were studied by real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot. **Results:** The incidence of NTDs in embryonic mice was 31.1% (19/61) after 4.5 mg/kg body weight MTX treatment, while there was no occurrence of NTDs in normal control group. Under the stereomicroscope, it can be seen that the neural tube of NTDs embryonic mice were not closed, while the normal embryonic mice were well developed. RT-qPCR showed that the expression level of *Lig3* mRNA in NTDs embryonic neural tissue of mice with folate metabolism disorder was significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). Western blot showed that compared with the control group, the level of *Lig3* protein in the neural tissue of NTDs embryonic mice with folate metabolism disorder decreased significantly ($P<0.05$).

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81600984; 81700777); 首都儿科研究所所级基金项目(FX-2018-05/04; CXYJ-2021-03)

作者简介: 李正莉(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 儿科学, 电话: 15611580862, E-mail: jocelynjbj@126.com

Δ 通讯作者: 王建华, 女, 博士研究生, 教授, 研究方向: 出生缺陷的分子生物学及分子流行病学研究, E-mail: fywjh@163.com;

王秀伟, 女, 博士研究生, 副研究员, 研究方向: 出生缺陷的分子生物学研究, E-mail: wangxiuwei1010@126.com

(收稿日期: 2022-01-10 接受日期: 2022-02-05)

Meanwhile, the expression of *Lig3* in neural stem cells treated with MTX was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The expression of apoptosis related protein cleaved caspase-3 in NTDs embryonic mice neural tissue and cell model after MTX treatment were increased significantly, which suggest that the apoptosis was increased. **Conclusion:** The low levels of *Lig3* causes the decreased DNA repair ability and the increased apoptosis that results in NTDs induced by folate metabolism disorder, which could offer new insight for preventing and controlling NTDs and birth defects.

Key words: Methotrexate; Folate; Neural tube defects; DNA repair

Chinese Library Classification (CLC): Q-33; Q132.7; Q593.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)11-2008-05

前言

神经管畸形(neural tube defects, NTDs)是以无脑儿、脑膨出、脊柱裂等为表型的最常见、最严重的神经系统出生缺陷性疾病,严重影响我国和世界人口的素质^[1,2]。目前,国内外学者尽管针对 NTDs 的防治进行了大量研究,但对 NTDs 发病机制认识仍存在不足,NTDs 治疗效果并不满意。在临床上 3 个月以上胎龄才能对胎儿异常做出诊断,此时已经失去了 NTDs 防治的最佳时机。此外,神经损伤修复及其困难。因此,深入研究 NTDs 的发病机制,提高对 NTDs 发生的分子机制认知,找出科学的防治方法,并在神经出现不可逆损伤之前给予适当的干预治疗极为重要,对于降低致畸率、致死率,提高人口素质具有十分重要的意义。

碱基切除修复(base excision repair, BER)是机体内最活跃的 DNA 损伤修复途径,为哺乳动物的正常发育所必须,其功能的缺失与神经紊乱等疾病相关^[3]。有研究显示,当机体缺乏叶酸时,BER 的功能下调而使得 DNA 损伤积累^[4],而叶酸缺乏与 NTDs 的发生密切相关,提示叶酸缺乏所导致的 NTDs 发生可能与 BER 的功能异常相关。DNA 连接酶 III 基因(DNA ligase III, *LIG3*)定位于 17 号染色体(17q11.2-q12),编码一个 1009 个氨基酸残基构成的蛋白质,是 BER 通路中的关键酶^[5],在肿瘤研究中其可作为潜在治疗靶点而受到研究者的关注^[6-8]。本课题组前期在叶酸缺乏的人群样本中,采用病例-对照的研究方法对 *Lig3* 基因的单核苷酸多态性进行了分析,结果研究发现 *Lig3* rs1052536 SNP 与 NTDs 的易感性有关,其 T/T 基因型可显著增加胚胎发生脑部 NTDs 的风险^[9]。提示叶酸缺乏情况下, *Lig3* 与 NTDs 的发生密切相关,但相关研究报道较少。本研究利用二氢叶酸还原酶抑制剂-甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX),模拟体内叶酸缺乏的内环境建立相应的小鼠 NTDs 动物模型及细胞模型。在此基础上探讨 *Lig3* 在 NTDs 发生过程中的表达情况,为在围孕期合理增补叶酸及 NTDs 个体化干预方案的建立提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 小鼠 NTDs 模型建立

无特定病原体(SPF)成年 C57BL/6J(7-8 周,18.5-20 g)小鼠 1:1 合笼过夜,第二天早 8 点分笼,检查到阴栓者定为孕 0.5 天,孕 7.5 天小鼠随机分为实验组和对照组,实验组孕鼠腹腔注射 4.5 mg/kg 体重的二氢叶酸还原酶抑制剂-MTX^[10],对照组孕鼠腹腔注射等体积的生理盐水,药物处理后,孕 10.5 天解剖胚胎统计胎鼠个数,畸形胎数,分析叶酸代谢紊乱对生长发育的影响。

1.2 细胞培养

分离孕 13.5 天小鼠胚胎神经组织,尽量去除所有血管,无菌 PBS 清洗两遍,剪碎成糜状,加入胰酶消化后,加入培养基充分吹打至所有组织块被充分吹散后,静置沉淀,弃上清。加入神经干培养基重悬之后接种于培养皿中,于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养。细胞传至 3 代进行后续实验。利用 MTT 的方法对 MTX 作用于细胞的最佳药物剂量进行摸索。

1.3 实时荧光定量 PCR

利用 Qiagen RNA 提取试剂盒提取组织和细胞中的总 RNA, nanodrop2000 超微量分光光度计对 RNA 的浓度进行测定。将 RNA 逆转成 cDNA 后,进行 qPCR 扩增。设定反应体系如下: 95℃, 2 min; 95℃, 15 s, 60℃, 30 s; 72℃, 30 s, 循环 40 次; 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因的相对表达量。引物设计结果如下: *Lig3*: 上游引物 GCTTACTTGTCTGGCTCTATC, 下游引物 CAGACTGAATGTTGCCTACTC, *Gapdh*: 上游引物 GAGATTGTTGCCATCAACGACC, 下游引物 CGTTGATGACAAGCTTCCCATC。

1.4 Western blot

利用试剂盒法提取组织及细胞中的总蛋白,用 BCA 法检测蛋白浓度。配制蛋白质样品后进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后将目的蛋白进行半干转至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,4℃ 过夜孵育 I 抗 *Lig3*、cleaved caspase-3(稀释比例 1:1000)。室温孵育 II 抗(稀释比例 1:2000)2 h。将膜浸泡于显色液中显色,超灵敏化学发光成像仪扫描分析蛋白表达情况,以 GAPDH 做内参。

1.5 统计学分析

应用 SPSS20.0 软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据采用独立样本 *t* 检验分析比较两组间的差异,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTX 影响胚胎神经发育

体视显微镜下观察发现对照组正常胎鼠发育良好,外形饱满,神经管闭合完全。实验组 NTDs 胎鼠神经管未闭合,结构紊乱,可见颅面部畸形,颅脊柱乃至全身异常以及发育迟缓(图1)。实验组胎鼠 NTDs 的发生率为 31.1%(19/61),在对照组中未观察到 NTDs 的发生,可见吸收胎及发育迟缓(表1)。

2.2 *Lig3* 在 NTDs 胚胎神经组织中的表达情况

对胚胎神经组织中 *Lig3* 的表达情况进行检测结果发现 NTDs 胚胎神经组织中 *Lig3* mRNA 水平的表达明显低于其在正常胚胎神经组织中的表达($P < 0.05$)。为了进一步验证这一结果,在蛋白水平上对 *Lig3* 进行了检测,结果同样发现,与对照

组相比,其蛋白表达水平明显降低($P<0.05$,图2)。

2.3 *Lig3* 在叶酸代谢障碍的神经干细胞中的表达情况

神经干细胞正常发育是神经管闭合的关键。根据 MTT 检测结果最终确定 200 nM 为 MTX 的最佳剂量,该剂量处理神经干细胞 24 h 后,检测 *Lig3* 的表达情况,结果发现在叶酸代谢紊乱的细胞模型中, *Lig3* 的表达无论是在 mRNA 水平还是在蛋白水平均呈现明显降低($P<0.05$,图3),这一结果与动物水

平一致。

2.4 MTX 对 NTDs 胚胎神经组织凋亡的影响

NTDs 的发生与细胞增殖凋亡密切相关。DNA 修复能力降低可导致凋亡的发生。因此我们对 NTDs 胚胎神经组织及 MTX 处理的神经干细胞中 cleaved caspase-3 的表达情况进行检测,结果发现在 NTDs 胚胎神经组织和 MTX 处理的神经干细胞中 cleaved caspase-3 的表达较对照组均明显增加(图4)。

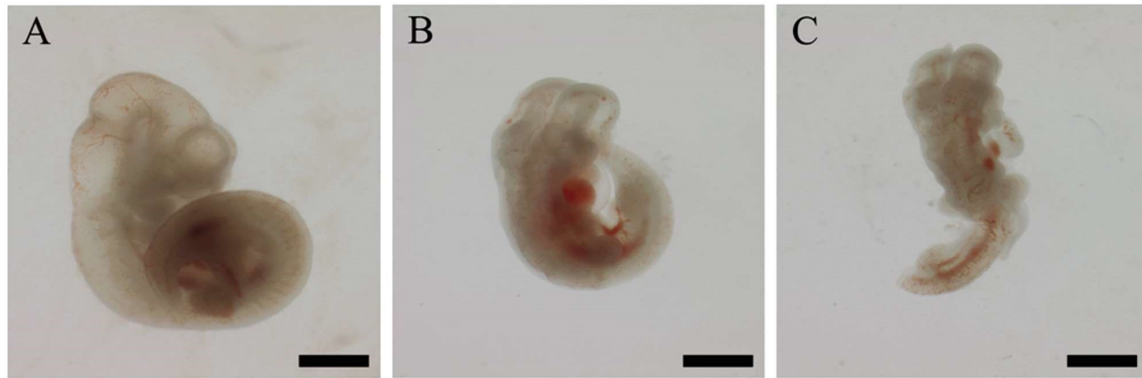


图1 MTX 对小鼠胚胎的影响

Fig.1 Effect of MTX on mice embryos

Note: A: Normal embryonic mice in the control group; B, C: MTX-treated NTDs embryonic mice; The scale is 1 mm.

表1 对照组与实验组小鼠的胚胎发育情况

Table 1 Embryonic development of mice in control group and experimental group

Groups	Number of embryos	Normal embryos (%)	Resorption (%)	Abnormal embryos (%)		
				NTDs	Other malformations	Growth retardation
Control	43	38(88.4)	3(7.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(4.7)
MTX	61	12(19.7)	15(24.6)	19(31.1)	6(9.8)	9(14.8)

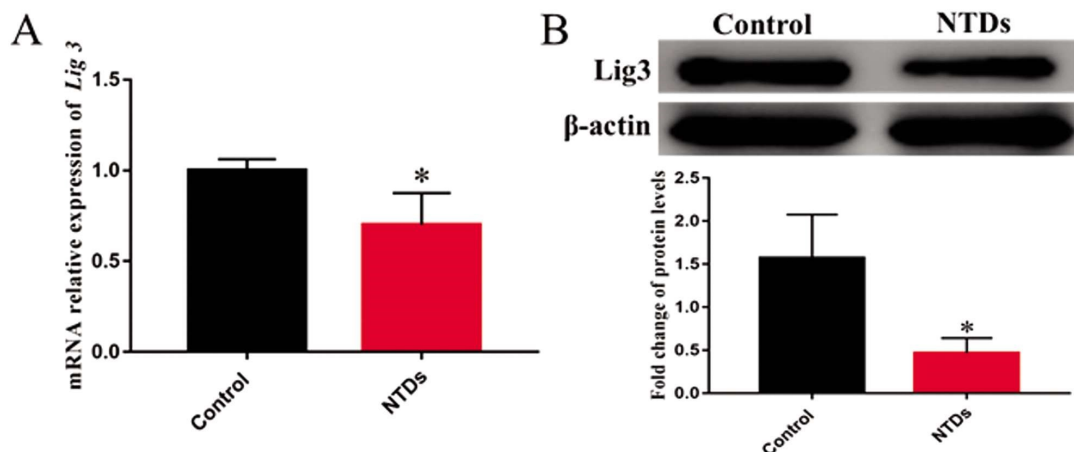


图2 *Lig3* 在胎鼠神经组织的表达情况

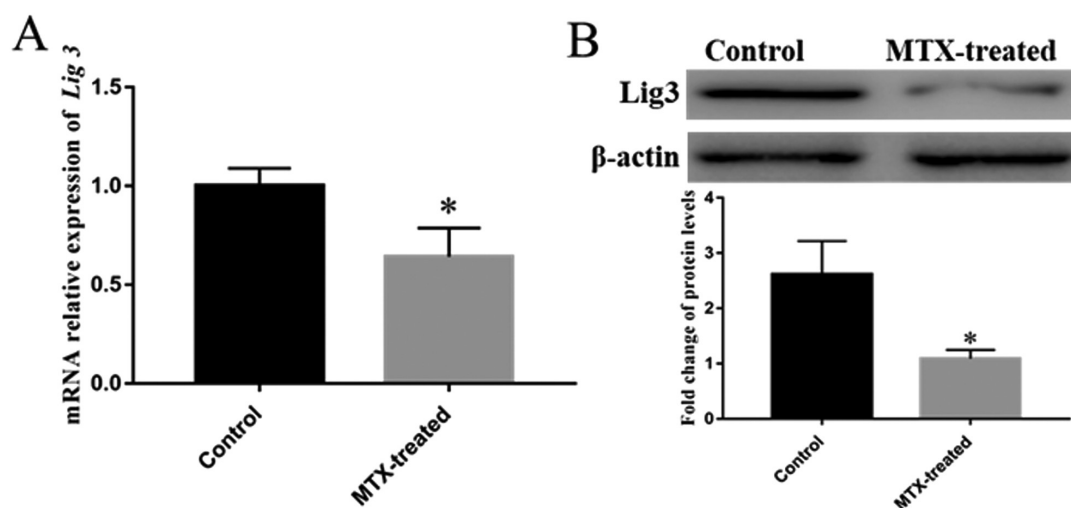
Fig.2 Expression of *Lig3* in embryonic neural tissues

Notes: A: the expression of *Lig3* mRNA in mice embryonic neural tissue detected by RT-qPCR; B: the expression of *Lig3* in mice embryonic neural detected by western blot.

3 讨论

随着我国三胎政策的开放,控制出生缺陷,提高人口质量,越来越成为民生关注的重点。神经管畸形(neural tube defects, NTDs)作为常最常见、最严重的出生缺陷性疾病之一,严重影响

响我国和世界人口素质。近几十年来国内外研究报道证实叶酸缺乏以及叶酸代谢障碍与 NTDs 的发生密切相关,且在围孕期及孕早期坚持每天服用推荐剂量的叶酸,能够降低 50-70% NTDs 的发生^[1,11-13]。但是,叶酸预防 NTDs 发生的机制至今并不清楚,而且随着关于叶酸研究的深入,有报道表明叶酸补充过

图3 *Lig3* 在 MTX 处理后神经干细胞中的表达情况Fig.3 The expression of *Lig3* in MTX-treated neural stem cell

Notes: A: the expression of *Lig3* mRNA in neural stem cell detected by RT-qPCR; B: the expression of *Lig3* in neural stem cell detected by western blot.

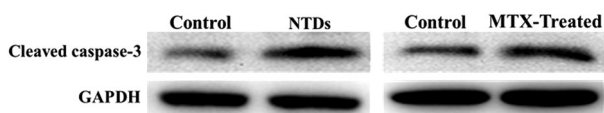


图4 Western blot 检测 cleaved caspase-3 的表达情况

Fig.4 The expression of cleaved caspase-3 detected by Western blot

量会增加癌症等疾病的发病风险^[14,15],也有研究者认为在食物中强化叶酸的做法会导致机体对叶酸的摄入量增加,从而导致后代对于一些致命性疾病的抵抗能力减弱^[16]。因此,深入理解叶酸在体内的代谢和作用机制,对正确、合理的利用叶酸预防出生缺陷及 NTDs 发生具有非常重要的意义。在前期研究中,我们发现利用 MTX 可以模拟体内叶酸缺乏的内环境,建立叶酸缺乏引起叶酸代谢障碍的 NTDs 动物模型^[10,17]。在此基础上我们也发现 MTX 诱导的 NTDs 胎鼠中存在基因组不稳定性^[17,18],这一结果与人群研究一致^[19,20]。推测基因组不稳定性是 NTDs 发生的重要因素。DNA 修复系统在保证 DNA 正常合成及 DNA 结构稳定性中起到重要作用,是维持机体基因组稳定性的关键角色,调控细胞增殖分化、组织器官发育^[21]。因此在叶酸缺乏的动物模型中探讨 DNA 修复在 NTDs 发生中作用十分必要,可为 NTDs 机制的阐明提供理论和实验依据。

在众多损伤修复通路中,碱基切除修复(base excision repair, BER) 通路是人类细胞多种 DNA 修复机制中在重要的修复途径之一,为哺乳动物的正常发育所必需,其功能的缺失与神经紊乱等疾病相关^[3]。有研究显示,当机体缺乏叶酸时,BER 的功能下调而使得 DNA 损伤积累^[4],而叶酸缺乏与 NTDs 的发生密切相关^[22]。因此,推测叶酸缺乏所导致的 NTDs 发生可能与 BER 功能异常相关。脱氧腺嘌呤核苷酸内切酶 1/氧化还原因子 1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox- factor 1, *APE1/Ref-1*)是 BER 途径的关键酶,可激活转录因子,如 p53, Pax5, Pax8 等,其中,已证明有些转录因子的异常与 NTDs 的发生相关,如 p53^[23]、Pax 家族^[24]。在胚胎形成早期机体需要 *APE1/Ref-1* 基因高表达来维持 DNA 修复功能以便保证包括神经管闭合在内的相关生理过程正常进行,既往动物实验发现,NTDs 的发生存在该基因的表达异常^[25]。在前期的研究中我们

也证实该基因的多态性与 NTDs 的发生密切相关^[26]。此外,在碱基切除修复基因与脊柱裂的病例-对照研究中,显示 *XRCC1* 基因 Arg399Gln 及 *hOGG1* 基因 Ser326Cys 多态性可增加脊柱裂的发生风险^[27]。这些研究表明 BER 通路 NTDs 密切相关。本课题组前期在叶酸缺乏的人群样本中,采用病例-对照的研究方法对 *Lig3* 基因的单核苷酸多态性进行了分析,结果研究发现 *Lig3* rs1052536 SNP 与 NTDs 的易感性有关,其 T/T 基因型可显著增加胚胎发生脑部 NTDs 的风险^[9],基于此推测在叶酸缺乏的情况下,碱基切除修复中的关键基因如 *Lig3* 可能与 NTDs 的发生密切相关。然而目前关于 *Lig3* 与 NTDs 发生关系的报道较少,为了验证这一推测,本研究利用 MTX 抑制二氢叶酸还原酶,模拟体内叶酸缺乏的内环境,建立叶酸缺乏即叶酸代谢障碍的 NTDs 动物及细胞模型,在模型建立成功的基础上,探讨碱基切除修复基因 *Lig3* 的表达情况。结果发现 *Lig3* 在 NTDs 胚胎组织中明显低表达,同时在细胞水平上我们也观察到 MTX 处理细胞后, *Lig3* 呈现低表达状态。

Lig3 在真核生物中是利用 ATP 水解供能而将双链 DNA 一条链的切口实现封闭的一类酶,在 DNA 复制、修复和重组等过程中均发挥着重要作用^[28-30]。以往研究发现,敲除 *Lig3* 基因具有胚胎致死性,敲除 *Lig3* 基因的胚胎在孕 8.5 天后发育出现停滞,孕 9.5 天出现大量细胞凋亡,最终胚胎死亡^[31]。而在小鼠神经系统条件性敲除 *Lig3* 基因,其小脑明显变小,颗粒神经元前体细胞增殖能力下降,而细胞凋亡增加,神经元的线粒体 DNA 含量均出现异常和损伤^[32]。这些研究表明 *Lig3* 在胚胎发育及胚胎神经发育中发挥重要作用。本研究在叶酸代谢障碍小鼠 NTDs 脑组织及神经干细胞中研究发现 *Lig3* 的表达明显低于对照组,同时也观察到凋亡增加,与之前报道一致。进一步证实了 *Lig3* 在胚胎发育乃至胚胎神经发育过程中发挥重要作用,为 *Lig3* 作为 NTDs 高危人群或易感个体的分子标志物提供了理论依据。

综上所述,本研究通过利用 MTX 干预孕鼠,模拟体内叶酸缺乏导致 NTDs 发生的内环境,观察胎鼠的畸形情况。结果发现 MTX 处理后胎鼠神经管明显未闭合,呈现 NTDs 表型。在

NTDs 胎鼠脑组织及相应的细胞模型中,检测到 *Lig3* 的表达明显降低,凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 的表达明显增高。推测在叶酸代谢障碍前提下,*Lig3* 表达降低,DNA 修复功能减弱,细胞凋亡增加,导致 NTDs 的发生,为出生缺陷的防控提供新思路,同时为该基因作为 NTDs 高危人群或易感个体的筛选的分子标志物提供了理论和实验依据。

参考文献(References)

- [1] Wallingford JB, Niswander LA, Shaw GM, et al. The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects[J]. Science, 2013, 339(6123): 1222-1227
- [2] Greene ND, Copp AJ. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube [J]. Prenat Diagn, 2009, 29(4): 303-311
- [3] Wallace SS, Murphy DL, Sweasy JB. Base excision repair and cancer [J]. Cancer Lett, 2012, 327(1-2): 73-89
- [4] Unnikrishnan A, Prychitko TM, Patel HV, et al. Folate deficiency regulates expression of DNA polymerase beta in response to oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(2): 270-280
- [5] Demin AA, Hirota K, Tsuda M, et al. XRCC1 prevents toxic PARP1 trapping during DNA base excision repair[J]. Mol Cell, 2021, 81(14): 3018-30 e5
- [6] Paes Dias M, Tripathi V, van der Heijden I, et al. Loss of nuclear DNA ligase III reverts PARP inhibitor resistance in BRCA1/53BP1 double-deficient cells by exposing ssDNA gaps[J]. Mol Cell, 2021, 81(22): 4692-708 e9
- [7] Rashid I, Hammel M, Sverzhinsky A, et al. Direct interaction of DNA repair protein tyrosyl DNA phosphodiesterase 1 and the DNA ligase III catalytic domain is regulated by phosphorylation of its flexible N-terminus[J]. J Biol Chem, 2021, 297(2): 100921
- [8] Caracciolo D, Di Martino MT, Amodio N, et al. miR-22 suppresses DNA ligase III addiction in multiple myeloma[J]. Leukemia, 2019, 33(2): 487-498
- [9] Li G, Wang X, Wang X, et al. Polymorphism rs1052536 in Base Excision Repair Gene Is a Risk Factor in a High-Risk Area of Neural Tube Defects in China[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 5015-5026
- [10] Zhao J, Guan T, Wang J, et al. Influence of the antifolate drug Methotrexate on the development of murine neural tube defects and genomic instability[J]. J Appl Toxicol, 2013, 33(9): 915-923
- [11] Au KS, Findley TO, Northrup H. Finding the genetic mechanisms of folate deficiency and neural tube defects-Leaving no stone unturned [J]. Am J Med Genet A, 2017, 173(11): 3042-3057
- [12] Salih MA, Murshid WR, Seidahmed MZ. Epidemiology, prenatal management, and prevention of neural tube defects [J]. Saudi Med J, 2014, 35 Suppl 1: S15-28
- [13] Pitkin RM. Folate and neural tube defects [J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85(1): 285S-288S
- [14] Fife J, Raniga S, Hider PN, et al. Folic acid supplementation and colorectal cancer risk: a meta-analysis[J]. Colorectal Dis, 2011, 13(2): 132-137
- [15] Pieroth R, Paver S, Day S, et al. Folate and Its Impact on Cancer Risk [J]. Curr Nutr Rep, 2018, 7(3): 70-84
- [16] Luccock M, Yates Z. Folic acid - vitamin and panacea or genetic time bomb?[J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(3): 235-240
- [17] Wang J, Wang X, Guan T, et al. Analyses of copy number variation reveal putative susceptibility loci in MTX-induced mouse neural tube defects[J]. Dev Neurobiol, 2014, 74(9): 877-893
- [18] Wang X, Guan Z, Chen Y, et al. Genomic DNA hypomethylation is associated with neural tube defects induced by methotrexate inhibition of folate metabolism[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121869
- [19] Chen X, Shen Y, Gao Y, et al. Detection of copy number variants reveals association of cilia genes with neural tube defects [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54492
- [20] Wang L, Wang F, Guan J, et al. Relation between hypomethylation of long interspersed nucleotide elements and risk of neural tube defects [J]. Am J Clin Nutr, 2010, 91(5): 1359-1367
- [21] Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(7): 3290-3295
- [22] Greene ND, Copp AJ. Neural tube defects [J]. Annu Rev Neurosci, 2014, 37: 221-242
- [23] Pangilinan F, Geiler K, Dolle J, et al. Construction of a high resolution linkage disequilibrium map to evaluate common genetic variation in TP53 and neural tube defect risk in an Irish population[J]. Am J Med Genet A, 2008, 146A(20): 2617-2625
- [24] Xiao Y, Zhang L, He K, et al. Characterization of a novel missense mutation on murine Pax3 through ENU mutagenesis [J]. J Genet Genomics, 2011, 38(8): 333-339
- [25] Albino D, Brizzolara A, Moretti S, et al. Gene expression profiling identifies eleven DNA repair genes down-regulated during mouse neural crest cell migration[J]. Int J Dev Biol, 2011, 55(1): 65-72
- [26] Wang X, Yue H, Li S, et al. Genetic Polymorphisms in DNA Repair Gene APE1/Ref-1 and the Risk of Neural Tube Defects in a High-Risk Area of China[J]. Reprod Sci, 2021, 28(9): 2592-2601
- [27] Olshan AF, Shaw GM, Millikan RC, et al. Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for spina bifida and orofacial clefts[J]. Am J Med Genet A, 2005, 135(3): 268-273
- [28] Ellenberger T, Tomkinson AE. Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights[J]. Annu Rev Biochem, 2008, 77: 313-38
- [29] Simsek D, Jasin M. DNA ligase III: a spotty presence in eukaryotes, but an essential function where tested [J]. Cell Cycle, 2011, 10(21): 3636-3644
- [30] Tomkinson AE, Naila T, Khattri Bhandari S. Altered DNA ligase activity in human disease[J]. Mutagenesis, 2020, 35(1): 51-60
- [31] Puebla-Osorio N, Lacey DB, Alt FW, et al. Early embryonic lethality due to targeted inactivation of DNA ligase III[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(10): 3935-3941
- [32] Gao Y, Katyal S, Lee Y, et al. DNA ligase III is critical for mtDNA integrity but not Xrcc1-mediated nuclear DNA repair [J]. Nature, 2011, 471(7337): 240-244