

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.20.001
文章编号: 1005-8982 (2019) 20-0001-07

基础研究·论著

INPP5E 基因影响小鼠胚胎神经管闭合的 分子机制研究*

高婷婷¹, 岳慧轩², 李莘², 秦佳星², 王秀伟², 官臻²,
牛勃², 郭金², 王建华², 钟儒刚¹

(1. 北京工业大学 环境与病毒肿瘤学北京市重点实验室, 北京 100124;
2. 首都儿科研究所 转化医学研究室, 北京 100020)

摘要: 目的 探讨肌醇多聚磷酸 5-磷酸酶 (INPP5E) 基因影响小鼠胚胎神经管闭合的分子机制。
方法 采用前期复制的神经管缺陷 (NTD) 小鼠模型, 在体视显微镜下观察胚胎表型、苏木精-伊红染色情况, 测量胚胎顶臀长、体重等指标; 重亚硫酸盐测序法检测 NTD 组及对照组胚胎发育第 11.5 天小鼠胚胎神经组织中 INPP5E 基因启动子区 DNA 甲基化情况; 实时荧光定量聚合酶链反应和 Western blotting 检测胚胎神经组织中 INPP5E 蛋白和 mRNA 相对表达量; 超高效液相色谱串联质谱法检测胚胎神经组织中叶酸 (FA)、5-甲基四氢叶酸 (5-MeTHF)、5-甲酰四氢叶酸 (5-FOoTHF) 及同型半胱氨酸 (Hcy) 水平。**结果** NTD 组小鼠胚胎神经组织 INPP5E 基因启动子区甲基化水平、INPP5E 蛋白和 mRNA 相对表达量在胚胎发育第 11.5 天时较对照组低 ($P < 0.05$)。NTD 组胚胎神经组织的 FA 和 Hcy 水平较对照组升高 ($P < 0.05$), 而 5-MeTHF 和 5-FOoTHF 水平较对照组低 ($P < 0.05$)。**结论** INPP5E 基因在调节小鼠胚胎神经管闭合中起重要作用。FA 代谢紊乱引起的 INPP5E 基因启动子区甲基化水平降低, 可能通过影响其表达水平参与 NTD 的发生。

关键词: 神经管; INPP5E 基因 / 基因; DNA 甲基化

中图分类号: R741

文献标识码: A

Molecular mechanism of INPP5E gene on embryonic neural tube closure in mice

Ting-ting Gao¹, Hui-xuan Yue², Shen Li², Jia-xing Qin², Xiu-wei Wang², Zhen Guan²,
Bo Niu², Jin Guo², Jian-hua Wang², Ru-gang Zhong¹

(1. Beijing Key Laboratory of Environmental and Viral Oncology, Beijing University of Technology,
Beijing 100124, China; 2. Department of Translational Medicine, Capital Institute
of Pediatrics, Beijing 100020, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of inositol polyphosphate 5-phosphatase IV (INPP5E) gene on embryonic neural tube closure in mice. **Methods** All NTD embryos were examined carefully using a dissecting microscope. The structure changes of neural tube tissues were detected by HE stain, the crown-rump length and body weight of embryos were measured. Bisulphite sequencing (BS) was used to detect the DNA methylation level within the promoter region of INPP5E in embryonic neural tissues of NTD and control group on embryonic day 11.5 (E 11.5). Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot was used

收稿日期: 2019-04-20

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81571443、81600984); 北京市自然科学基金 (No: 7174285、7172038)

[通信作者] 钟儒刚, E-mail: lifesci@bjut.edu.cn

to detect the transcription and expression levels of the INPP5E gene in neural tube tissues on E 11.5. UPLC-MS/MS was used to detect the level of folic acid (FA), 5-methyltetrahydrofolate (5-MeTHF), 5-formyltetrahydrofolate (5-FoTHF) and homocysteine (Hcy) in embryonic neural tissues. **Results** Compared with control group, the methylation level of INPP5E promoter region in embryonic neural tissues were lower in NTD group on E 11.5 ($P < 0.05$), and the transcription level and the expression level of INPP5E were decreased ($P < 0.05$). Meanwhile, the concentrations of FA (2.76 ± 0.98 VS 4.39 ± 1.41 mg/g) and Hcy (4.33 ± 1.42 VS 7.06 ± 1.38 mg/g) increased ($P < 0.05$), and the concentrations of 5-MeTHF (9.55 ± 2.38 VS 4.62 ± 1.98 mg/g) and 5-FoTHF (4.86 ± 1.02 VS 3.19 ± 0.75 mg/g) decreased in embryonic neural tissues in the NTD group compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The INPP5E gene plays an important role in regulation of embryonic neural closure. Reduced methylation level in INPP5E promoter region caused by folic acid metabolic disorder may be involved in the etiology of NTD by affecting its expression.

Keywords: neural tube; INPP5E gene; DNA methylation

肌醇多聚磷酸 5-磷酸酶 (INPP5E) 基因编码 INPP5E 蛋白, 该基因敲除后小鼠出现无脑和露脑的神经管缺陷 (neural tube defects, NTD) 表型^[1-3]。NTD 为胚胎中枢神经系统先天畸形, 是环境因素与遗传因素复杂交互作用的结果, 环境因素包括母体营养、地理及社会经济状况等, 而母体叶酸 (folic acid, FA) 与 NTD 的发生密切相关^[4-8]。FA 在体内以四氢叶酸的形式参与一碳单位的代谢, 与 DNA 甲基化过程等表观遗传修饰相关。本研究通过 FA 缺乏 NTD 小鼠模型, 研究该基因影响胚胎神经管闭合的分子机制, 为 NTD 的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 7 ~ 8 周体重 18 ~ 20 g 的无特定病原体级 C57BL/6J 成年健康雌鼠 20 只 (北京维通利华实验动物技术有限公司)。在 20 ~ 24℃ 恒温、40% ~ 60% 恒湿的条件下, 鼠繁殖饲料喂养 (北京维通利华实验动物技术有限公司), 常规饮水, 自由取食。动物房中不定时提供食物和水。本研究已获得首都儿科研究所实验动物伦理委员会的批准 (批准号: DWLL2016004)。

1.1.2 试剂和仪器 兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、INPP5E 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司), 蛋白上样缓冲液 (上海碧云天生物技术公司), 脱脂奶粉 (美国 BD Difco 公司), 预染 Marker (美国 Thermo Scientific 公司), 30% 聚丙烯酰胺 (上海碧云天生物技术公司), 一步法动物组织活性蛋白提取试剂盒 (上海生工生物工程股份有限公司), DNA 提取纯化试剂

盒 (德国 QIAGEN 公司), DNA 修饰试剂盒 (美国 Chemicon 公司)。EG1150 石蜡包埋机 (德国 Leica 公司), Model200/2.0 蛋白质电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司), 221BR Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (美国 Bio-Rad 公司), Image Quant LAS 4000mini (美国 General Electric 公司), 酶标仪 (美国 Perkin Elmer 公司), 7500 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司), 多用凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司), 超高效液相色谱-串联四极杆质谱联用仪 (美国 Waters 公司) 等。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及标本采集 雌鼠体重达 20 g 后, 与雄鼠合笼过夜 (18:00 至次日 6:00), 次日观察是否出现阴栓, 出现阴栓可认为 12:00 时为胚胎发育第 0.5 天。

取 16 只孕鼠, 在胚胎发育第 7.5 天时随机分为对照组和 NTD 组进行处理, 每组 8 只。对照组腹腔注射 0.9% 氯化钠 NaCl, NTD 组采用腹腔注射 4.5 mg/kg 甲氨蝶呤, 干扰 FA 代谢从而复制 NTD 小鼠模型^[9-10]。在胚胎发育第 11.5 天颈部脱臼处死小鼠, 取胚胎, 体视显微镜下观察胚胎畸形情况。

1.2.2 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色 将胚胎固定于 100 g/L 甲醛溶液中, 在乙醇溶液中脱水, 在二甲苯溶液中浸泡, 之后放入石蜡嵌入包埋, 将石蜡块用组织切片机进行神经管组织部位切片, 厚度为 5 mm, 将切片放入二甲苯和乙醇溶液中脱蜡, 随后放入苏木精染色液中约 10 min, 水冲洗后用伊红液浸染 3 min, 再置于水中洗去浮色。

1.2.3 超高效液相色谱串联质谱法 取 20 ml 小鼠血浆, 加入 1.0 g 活性炭, 冰上轻柔搅拌 1 h, 4℃、

20 000 r/min 离心 5 min, 上清为无 FA 小鼠血浆结合酶, 分装储存于 -70°C 备用。第 11.5 天用提取缓冲液对对照组及 NTD 组小鼠胚胎神经组织样品进行匀浆。100 $^{\circ}\text{C}$ 加热提取 15 min, 20 000 r/min 离心 15 min, 在上清中加入血浆结合酶, 将多聚谷氨酸 FA 分解为小分子的单谷氨酸 FA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h 后 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 20 000 r/min 离心 20 min, 用超高效液相色谱串联质谱法检测上清液。

1.2.4 重亚硫酸盐测序法 在两组小鼠胚胎发育第 11.5 天采用重亚硫酸盐测序法检测胚胎神经组织中 *INPP5E* 基因启动子区 DNA 甲基化水平。使用 DNA 提取纯化试剂盒提取基因组 DNA 于 -20°C 保存。NTD 组 DNA 采用 DNA 修饰试剂盒进行重亚硫酸盐处理, 将 NTD 组中未发生甲基化的胞嘧啶 (C) 转变成尿嘧啶 (U), PCR 扩增后转化为胸腺嘧啶 (T), 反之发生甲基化的 C 无变化。利用 UCSC 在线查询 *INPP5E* 基因 CpG 岛, 使用 Methyl Primer Express V1.0 软件设计重亚硫酸盐测序法引物, 正向引物: 5' -GGTTTAGTTATTGGGAAGGAGT-3', 反向引物: 5' -AAATTAACAAAATTAATCCACCAAAA-3'。扩增产物长度为 328 bp, 共检测该区域 8 个 CpG 甲基化位点。PCR 反应体系为 50 μl , 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 7 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 在 300 mm 紫外灯下观察结果, 凝胶成像分析系统记录处理数据, 纯化后经 Sanger 法测序, 使用 BiQ Analyzer 软件进行分析, 将 C 信号的峰高与 C+T 信号的峰高进行比较, 来定量每个 CpG 二核苷酸位点中的甲基化水平。

1.2.5 Western blotting 通过 Western blotting 检测 *INPP5E* 蛋白的相对表达量。在胚胎发育第 11.5 天对发育正常小鼠胚胎及发育缺陷小鼠胚胎进行解剖, 收集神经组织, 用 CelLytic MT 蛋白裂解液提取正常胚胎神经组织总蛋白, 使用布拉德福德光谱蛋白质法测蛋白含量。对蛋白进行 SDS-PAGE 后取下凝胶, 进行电转移, 电转移后的聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 在 10% 脱脂牛奶中室温轻摇, 封闭 1.5 h。将 PVDF 放入玻璃皿内, 加入一定体积稀释的 I 抗 (1 : 1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。之后用抗鼠 II 抗 (1 : 2 000) 室温孵育 2 h。用增强化学发光液 ECL 显色, 使用影像处理软件分析, GAPDH 作为内参蛋白。

1.2.6 qRT-PCR 采用 qRT-PCR 检测两组胚胎发育第 11.5 天小鼠胚胎神经组织中 *INPP5E* mRNA 的相对表达量。20 μl PCR 反应液: SYBR[®] Premix DimerEraser[™] (2 \times) 10 μl 、PCR 正向引物 (10 μmol) 0.6 μl 、PCR 反向引物 (10 μmol) 0.6 μl 、ROX 参比染料 (50 \times) 0.4 μl 、模板 2 μl 、ddH₂O 6.4 μl , 采用序列分析和熔解曲线分析对 PCR 产物的特异性进行检验。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 32 s, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 34 s。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验; 计数资料以率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠胚胎表型及 HE 染色结果

对照组小鼠胚胎发育第 11.5 天胚胎外观较为饱满圆滑, 头部前、中及后脑泡均已经发育形成, 脊柱表面完整无裂口 (见图 1A); 可见明显的耳泡、眼泡, 尾部弯曲细长。HE 染色显示神经管发育良好, 细胞排列密集整齐 (见图 1B、C)。

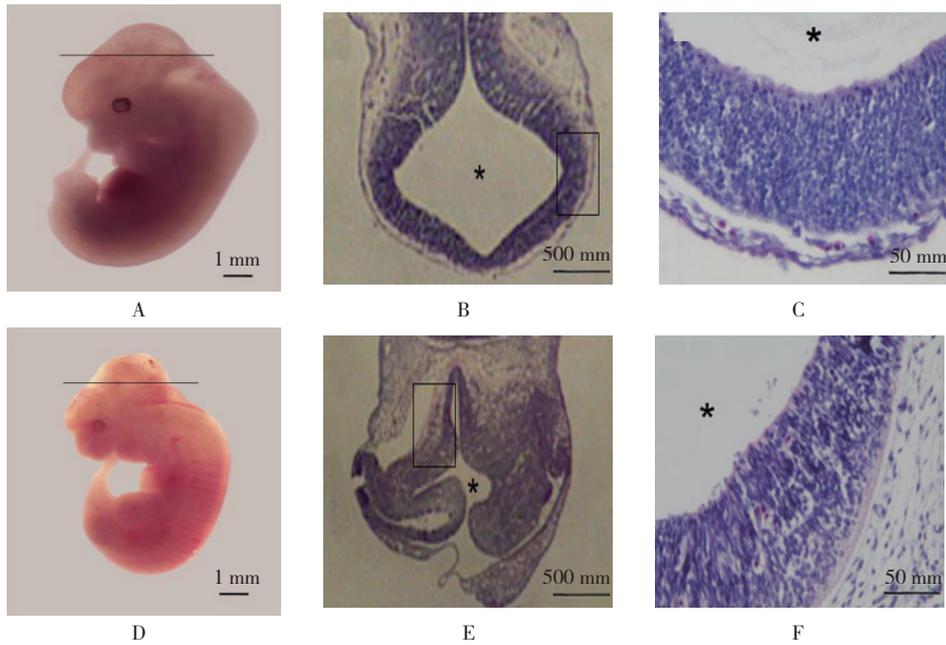
NTD 组小鼠胚胎的后脑部位神经管未闭合, 神经组织裸露在胚胎外 (见图 1D)。HE 染色显示后脑顶板未闭合, 神经腔面不完整, 且细胞排列疏松 (见图 1E、F)。

2.2 两组小鼠胚胎一般资料比较

两组胚胎的顶臀长度比较, 采用 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 24.480, P = 0.002$), NTD 组短于对照组。两组胚胎的体重比较, 采用 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 41.860, P = 0.001$), NTD 组低于对照组。两组胚胎畸形率比较, 采用 Fisher 确切概率法, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。见表 1。

2.3 两组 *INPP5E* 基因启动子区甲基化水平比较

在引物扩增的 328 bp 区域中, 包含 8 个 CpG 二核苷酸。对照组与 NTD 组 CpG 甲基化水平分别为 40.6% 和 9.4%, NTD 组与对照组甲基化程度的比率为 23.2%。两组 *INPP5E* 基因启动子区的甲基化水平比较, 采用 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 33.330, P = 0.000$), NTD 组低于对照组。见图 2。



A: 对照组胚胎; B: 对照组胚胎后脑; C: 对照组胚胎后脑 HE 染色结果; D: NTD 组胚胎 (露脑畸形); E: NTD 组胚胎后脑; F: NTD 组胚胎后脑 HE 染色结果。* 为第四脑室。

图 1 两组小鼠胚胎发育第 11.5 天的胚胎表型及 HE 染色结果

表 1 两组胚胎一般资料比较

组别	窝数	胚胎数 / 个	NTD / 只	畸形率 / %	顶臀长度 / (mm, $\bar{x} \pm s$)	体重 / (mg, $\bar{x} \pm s$)
对照组	8	65	0	0.0	6.41 ± 0.51	22.42 ± 3.28
NTD 组	8	59	19	32.2	4.29 ± 0.36	9.61 ± 3.81

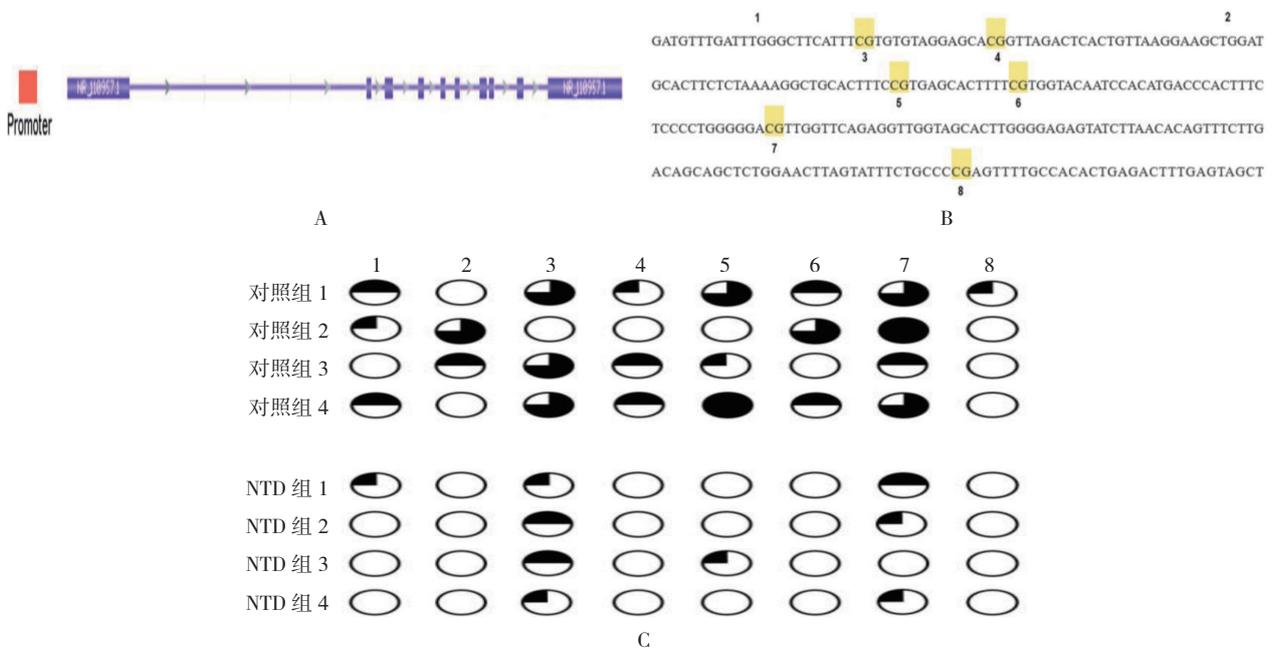


图 2 INPP5E 基因 CpG 岛的甲基化

2.4 两组小鼠胚胎组织中 INPP5E 相对表达量比较

对照组和 NTD 组小鼠胚胎发育第 11.5 天时 INPP5E 蛋白相对表达量分别为 (1.000 ± 0.230) 和 (0.482 ± 0.080) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.981, P=0.027$), NTD 组低于对照组。对照组和 NTD 组 INPP5E mRNA 相对表达量分别为 (1.000 ± 0.117) 和 (0.623 ± 0.034) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=7.867, P=0.016$), NTD 组低于对照组。NTD 组小鼠胚胎神经组织中, INPP5E 基因启动

子区的低甲基化可能是引起 INPP5E mRNA 表达降低的原因, 从而影响胚胎神经管的发育。见图 3、4。

2.5 两组小鼠胚胎神经组织中 FA 及其相关代谢产物水平比较

在最佳的超高效液相色谱条件下分离检测 FA 及其相关代谢产物 5-甲基四氢 FA (5-methyltetrahydrofolate, 5-MeTHF)、5-甲酰四氢 FA (5-formyltetrahydrofolate, 5-FoTHF) 和同型半胱氨酸 (Homocysteine, Hcy) 水平, 分别在 2.82、2.53、2.88 和 0.71 min 被洗脱, 进一步通过串联质谱进行定量分析。见图 4。

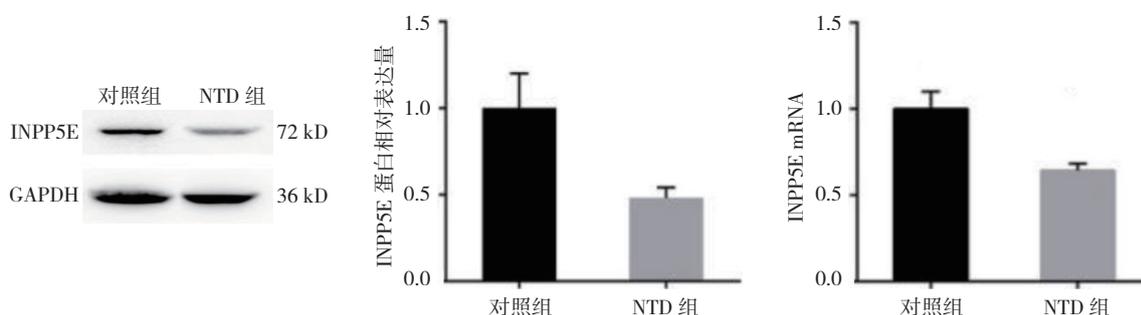


图 3 两组小鼠胚胎组织中 INPP5E 蛋白和 mRNA 表达水平比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

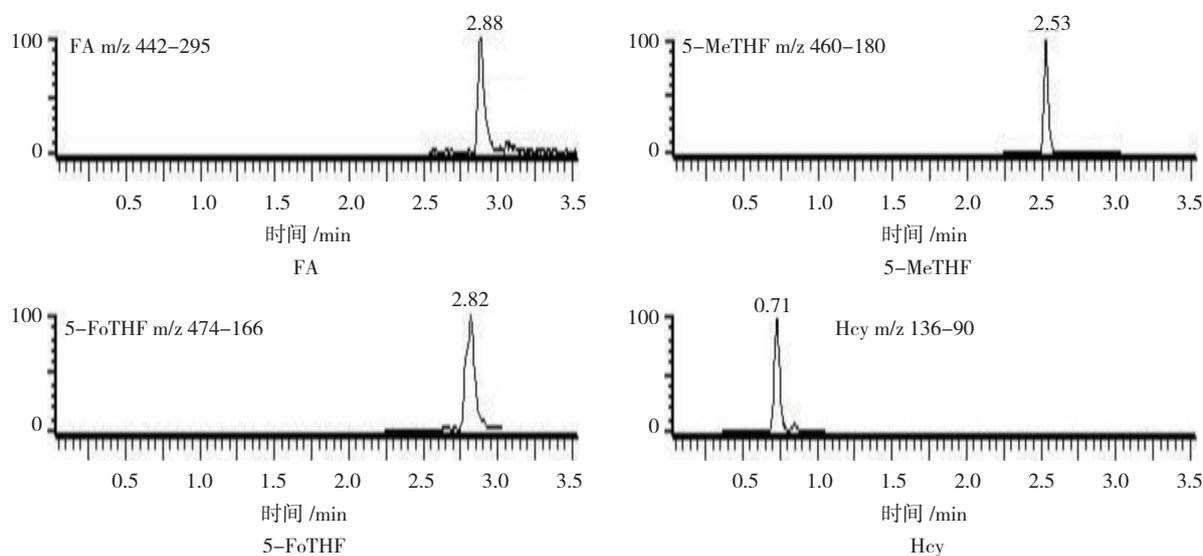


图 4 FA 及其相关代谢产物质谱多反应监测色谱图

FA 在对照组及 NTD 组中的含量分别为 (2.76 ± 0.98) 和 (4.39 ± 1.41) mg/g, 5-MeTHF 的含量分别为 (9.55 ± 2.38) 和 (4.62 ± 1.98) mg/g, 5-FoTHF 的含量分别为 (4.86 ± 1.02) 和 (3.19 ± 0.75) mg/g, Hcy 的含量分别为 (4.33 ± 1.42) 和 (7.06 ± 1.38) mg/g。两组小鼠胚胎神经组织中 FA、5-MeTHF、5-FoTHF

及 Hcy 水平比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=6.566、21.350、10.710$ 和 $118.200, P=0.022、0.002、0.009$ 和 0.000), NTD 组小鼠胚胎神经组织中 FA 和 Hcy 水平高于对照组, NTD 组小鼠胚胎神经组织中 5-MeTHF 和 5-FoTHF 水平低于对照组。见图 5。

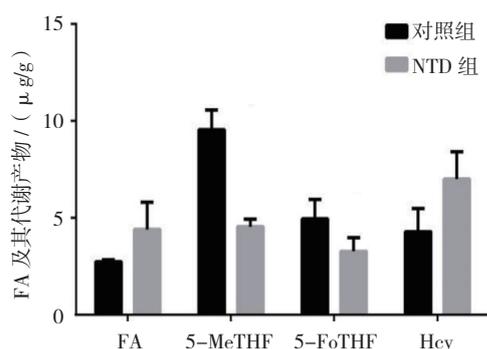


图 5 两组小鼠胚胎神经组织中 FA 及其相关代谢产物水平比较 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

3 讨论

INPP5E 基因调节肌醇信号通路活性, 参与胚胎神经发育, 其编码的 *INPP5E* 蛋白存在于神经细胞的细胞质、细胞骨架、纤毛轴丝、高尔基体、高尔基体膜、外周膜蛋白及质膜内侧^[11-14]。有研究发现, *INPP5E* 基因突变导致茹贝尔综合征等疾病^[15-17]。有研究显示, *INPP5E* 基因表达影响初级纤毛稳定性, 进而调控神经管的闭合^[18-20]。有学者报道 *INPP5E* 基因突变与神经管畸形相关, 神经管畸形是纤毛相关疾病的主要表型之一, 是一种严重的出生缺陷, 是由多种因素导致的神经管部分或完全闭合不全, 进而影响神经系统发育^[21]。*INPP5E* 基因突变会引起 PI(3,4,5)P3 和 PI(4,5)P2 的生成产物减少, 并通过改变 PI3K 信号通路影响细胞增殖、存活、凋亡及初级纤毛稳定性, 从而导致后脑畸形及纤毛相关疾病^[22-25]。

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰, 参与基因表达调控, 影响胚胎生长发育^[26]。低甲基化的 DNA 在有丝分裂中易发生重组, 导致基因发生缺失或易位, 最终影响基因表达^[27]。有研究报道 NTD 小鼠胚胎中, 与细胞增殖相关的 *Ptch1*、*Pla2g4a*、*Foxgl* 基因的甲基化水平与对照组相比显著降低, 且 qRT-PCR 结果与甲基化水平改变相关, 推测甲基化的改变在 NTD 发生过程中发挥重要作用^[28]。本研究采用腹腔注射 4.5 mg/kg 甲氨蝶呤, 干扰 FA 代谢从而复制 NTD 小鼠模型, 通过检测对照组及 NTD 组小鼠胚胎中的 FA 及其代谢产物, 发现 NTD 组小鼠胚胎神经组织的 FA 含量明显升高, 且代谢产物 5-MeTHF 和 5-FoTHF 的含量明显降低, 说明此时 FA 代谢呈现紊乱趋势; *INPP5E* 基因启动子区甲基化水平的显著降低, 推测 FA 代谢失衡引起甲基化供体不足, 导致 *INPP5E* 基因启动子区甲

基化水平显著降低, 从而影响该基因的正常表达, 干扰神经管的闭合。以上结果表明在神经发育早期, 需要 *INPP5E* 基因在一定水平上表达调控神经管正常闭合。

本研究发现 NTD 小鼠胚胎 *INPP5E* 蛋白和 mRNA 相对表达量低于正常小鼠。说明 *INPP5E* 基因在发育早期影响神经系统发育, 本研究结果表明 NTD 小鼠胚胎神经组织的 *INPP5E* 蛋白和 mRNA 相对表达量下降, 参与 FA 代谢紊乱神经管闭合失败, 造成小鼠露脑畸形。*INPP5E* 基因表达水平的改变是否通过 PI3K 信号通路活性影响初级纤毛形成, 其具体机制尚需在细胞内干扰 *INPP5E* 基因的表达, 如用 *CRISPR-Cas9* 基因编辑技术在小鼠胚胎神经干细胞上进行 *INPP5E* 基因敲除实验。同时, 检测 PI(3,4,5)P3 和 PI(4,5)P2 及初级纤毛的形成可进一步研究该基因对胚胎神经发育的影响。

因此, *INPP5E* 基因在调节胚胎神经发育中起重要作用, NTD 组小鼠胚胎神经组织中该基因的表达降低, 推测由于 FA 代谢失衡引起甲基化供体不足, 使该基因启动子区发生低甲基化, 进而引起基因异常表达导致 NTD 的发生。对 *INPP5E* 基因调控胚胎神经发育分子机制的进一步阐明, 对神经系统发育缺陷相关疾病的早期诊断及防控具有重要的意义。

参 考 文 献:

- [1] HUMPHRAY S J, OLIVER K, HUNT A R, et al. DNA sequence and analysis of human chromosome 9[J]. *Nature*, 2005, 437(7058): 551-555.
- [2] HORAN K A, WATANABE K, KONG A M, et al. Regulation of Fc gamma R-stimulated phagocytosis by the 72-kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase: SHIP1, but not the 72-kDa 5-phosphatase, regulates complement receptor 3-mediated phagocytosis by differential recruitment of these 5-phosphatases to the phagocytic cup[J]. *Blood*, 2007, 110(13): 4480-4491.
- [3] DYSON J M, CONDUIT S E, FEENEY S J, et al. *INPP5E* regulates phosphoinositide-dependent cilia transition zone function[J]. *Journal of Cell Biology*, 2017, 216(1): 247-263.
- [4] YE Y, JIN L, WILMOTT J S, et al. PI(4,5)P2 5-phosphatase A regulates PI3K/Akt signalling and has a tumour suppressive role in human melanoma[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1508.
- [5] ZHAO Z, CAO L, REECE E A. Formation of neurodegenerative aggresome and death-inducing signaling complex in maternal diabetes-induced neural tube defects[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(17): 4489-4495.
- [6] MENG X, SUN Y, DUAN W, et al. Meta-analysis of the association

- of maternal smoking and passive smoking during pregnancy with neural tube defects[J]. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2018, 140: 18-25.
- [7] MOLLOY A M, PANGILINAN F, BRODY L C. Genetic risk factors for folate-responsive neural tube defects[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2017, 37(1): 269-291.
- [8] BERRY R J, BAILEY L B, CRIDER K S. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions[J]. *Nutrients*, 2011, 3(3): 370-384.
- [9] 徐文婧, 关涛, 王建华, 等. MTX 诱导神经管畸形动物模型的建立 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(25): 4837-4842.
- [10] YUE H, ZHU X, LI S, et al. Relationship between INPP5E gene expression and embryonic neural development in a mouse model of neural tube defect[J]. *Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental & Clinical Research*, 2018, 24: 2053-2059.
- [11] KISSELEVA M, WILSON M P. The isolation and characterization of a cDNA encoding phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(26): 20110-20116.
- [12] THOMAS S, WRIGHT K J, CORRE S L, et al. A homozygous PDE6D mutation in Joubert syndrome impairs targeting of farnesylated INPP5E protein to the primary cilium[J]. *Human Mutation*, 2014, 35(1): 137-146.
- [13] BIELAS S L, SILHAVY J L, BRANCATI F, et al. Mutations in INPP5E, encoding inositol polyphosphate-5-phosphatase E, link phosphatidylinositol signaling to the ciliopathies[J]. *Nature Genetics*, 2009, 41(9): 1032-1036.
- [14] AGUILAR A. Ciliopathies: inpp5e links lipids, cysts and cilia[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2016, 12(9): 508.
- [15] PURKAIT R, BASU R, DAS R, et al. Association of Joubert syndrome and hirschsprung disease[J]. *Indian Pediatrics*, 2015, 52(1): 61-62.
- [16] TRAVAGLINI L, BRANCATI F, SILHAVY J, et al. Phenotypic spectrum and prevalence of INPP5E mutations in Joubert syndrome and related disorders[J]. *European Journal of Human Genetics*, 2013, 21(10): 1074-1078.
- [17] SLAATS G G, ISABELLA C R, KROES H Y, et al. MKS1 regulates ciliary INPP5E levels in Joubert syndrome[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2016, 53(1): 62-72.
- [18] ERAMO M J, MITCHELL C A. Regulation of PtdIns (3,4,5) P3/Akt signalling by inositol polyphosphate 5-phosphatases[J]. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44(1): 240-252.
- [19] HAKIM S, DYSON J M, FEENEY S J, et al. Inpp5e suppresses polycystic kidney disease via inhibition of PI3K/Akt-dependent mTORC1 signaling[J]. *Human Molecular Genetics*, 2016, 25(11): 2295-2313.
- [20] HAKIM S, BERTUCCI M C, Conduit S E, et al. Inositol polyphosphate phosphatases in human disease[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2012, 362(362): 247-314.
- [21] XU W, JIN M, HU R, et al. The Joubert syndrome protein Inpp5e controls ciliogenesis by regulating phosphoinositides at the apical membrane[J]. *Journal of the American Society of Nephrology Jasn*, 2016, 28(1): 118-129.
- [22] KISSELEVA M V, CAO L, MAJERUS P W. Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits Akt / Protein Kinase B phosphorylation and leads to apoptotic cell death[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(8): 6266-6272.
- [23] LUO N, LU J, SUN Y. Evidence of a role of inositol polyphosphate 5-phosphatase INPP5E in cilia formation in zebrafish[J]. *Vision Research*, 2012, 75(303): 98-107.
- [24] GREENE N D, LEUNG K Y, COPP A J. Inositol, neural tube closure and the prevention of neural tube defects[J]. *Birth Defects Research*, 2017, 109(2): 68-80.
- [25] TRAVAGLINI L, BRANCATI F, SILHAVY J, et al. Phenotypic spectrum and prevalence of INPP5E mutations in Joubert syndrome and related disorders[J]. *European Journal of Human Genetics*, 2013, 21(10): 1074-1078.
- [26] WU C T, MORRIS J R. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence[J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1103-1105.
- [27] WILLIAMS K, CHRISTENSEN J, PEDERSEN M T, et al. Tet1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity[J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 343-348.
- [28] 季成, 王秀伟, 王建华, 等. 甲氨蝶呤对早期神经胚基因表达的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(26): 5058-5062.

(李科 编辑)