

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.001

· 基础研究 ·

叶酸缺乏对小鼠胚胎干细胞 Nespas DMR 区甲基化修饰的影响 *

李睿 常韶燕 王理 刘驰 张霆[△]

(北京大学首都儿科研究所教学医院 北京 100020)

摘要 目的:探讨叶酸缺乏对小鼠胚胎干细胞(ESCs)中 Nespas 差异甲基化区域(Differentially Methylated Region, DMR)甲基化修饰的影响以及叶酸浓度与甲基化水平的关系。**方法:**多种不同浓度叶酸处理小鼠 ESCs,化学发光免疫分析法检测 ESCs 细胞内叶酸浓度。利用 MassARRAY 技术平台检测三种不同叶酸浓度处理后的 ESCs 中 Nespas DMR 启动子区、外显子区和内含子区甲基化修饰状态,并且分析 Nespas DMR 启动子区、外显子区和内含子区甲基化水平与叶酸浓度之间的关系。**结果:**无叶酸组(FF)小鼠 ESCs 细胞内叶酸浓度显著低于低叶酸组(FD)与正常叶酸组(FN)($P<0.05$)。Nespas DMR 中启动子区、外显子区以及内含子区甲基化水平在 FF 组显著低于 FD 和 FN 组($P<0.05$),并且 Nespas DMR 中启动子区以及内含子区甲基化水平与叶酸浓度存在显著的正相关($P<0.05$)。**结论:**叶酸缺乏影响小鼠 ESCs 中 Nespas DMR 区甲基化修饰的建立。

关键词:叶酸;Nespas DMR;甲基化

中图分类号:Q95-3,R723.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)12-2201-04

The Nespas DMR hypomethylation in folate-deficient mouse embryonic stem cells*

LI Rui, CHANG Shao-yan, WANG Li, LIU Chi, ZHANG Ting[△]

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

ABSTRACT Objective: We determined whether the methylation level of Nespas DMR was affected by the folate deficiency in the mouse ESCs and the relations between the methylation levels and the folate concentrations. **Methods:** Mouse ESCs were treated with various concentrations of folate and intracellular folate content was measured by chemiluminescent immunoassay. Methylation levels of the promoter region, exon region and intron region in Nespas DMR were examined by MassARRAY platform. The relationships between the methylation levels and the folate concentrations were analyzed by Pearson's correlation. **Results:** The intracellular folate concentration decreased under folate-deficient condition($P<0.05$). Folate insufficiency induced significantly lower methylation level in folate-free group (FF) compared with that in folate-deficient group (FD) and folate-normal group (FN) ($P<0.05$). Moreover, methylation levels of the promoter region and the intron region within Nespas DMR were positively correlated with folate content ($P<0.05$). **Conclusion:** Our data indicated that folate deficiency led to reduced Nespas DMR methylation in mouse ESCs.

Key words: Folate; Nespas DMR; Methylation

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

Article ID:1673-6273(2014)12-2201-04

前言

叶酸是人类的必需维生素,参与 DNA 的合成和甲基化过程,与细胞分化、增殖密切相关。叶酸参与一碳单位代谢过程,提供活化的甲基基团(S-adenosylmethionine SAM),在 DNA 甲基化中起着重要的作用^[1,2]。临床研究及动物实验已证实母体叶酸缺乏或代谢异常与包括宫内发育迟缓(intrauterine growth restriction IUGR),低体重儿(low birth weight)和神经管畸形(neural tube defects NTDs)等在内的多种胚胎生长发育异常密切相关^[3-5]。流行病学调查显示围孕期叶酸补充可降低子代出生缺陷的发病率,但是其机制还未明确^[6,9]。

围孕期母源叶酸缺乏影响胚胎发育过程中 DNA 的甲基化过程,而 DNA 甲基化是印迹基因的主要调节方式^[10,11]。印迹基因在胚胎的生长发育过程中发挥重要的作用,是平衡后代的亲本资源分配的重要机制^[12]。因此可以影响印迹基因表达的遗传或者表观遗传紊乱都可以导致多种与印迹基因相关的出生缺陷,包括 IUGR 等。Nespas 印迹基因位于人类第 20 号染色体和小鼠第 2 号染色体,具有高度保守性。Nespas 印迹基因受 Nespas DMR 调控。Nespas 编码 non-coding RNA--Nespas,是 Nesp 的反向转录本,调节 Nesp 的转录表达^[13,14]。Nesp 编码 Nesp55 蛋白,为嗜铬样神经内分泌蛋白,是多种内分泌和神经内分泌肿瘤的生物标记物^[15]。Sally A.Eaton 等证实 Nesp 参与胚

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81370967/H0724,81270699/H0417,81102117/H2603);北京市自然科学基金项目(7132036)

作者简介:李睿(1988-),女,硕士研究生,主要研究方向:营养与发育健康

△ 通讯作者:张霆, E-mail:zhangtingcv@126.com

(收稿日期:2013-12-15 接受日期:2014-01-15)

胎的生长发育过程,促进生长发育^[16]。

目前叶酸缺乏对印记基因 Nespas DMR 区甲基化的影响还未明确。因此我们建立了早期胚胎内细胞团来源小鼠 ESCs 的叶酸缺乏细胞模型,使用基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱分析技术(MALDI-TOF)检测 Nespas DMR 区的甲基化水平,并且分析了叶酸水平与甲基化水平之间的相关性,评价叶酸缺乏对 Nespas DMR 甲基化的影响。

1 材料与方法

1.1 小鼠 ESCs 培养

小鼠 ESCs(Sv129)从北京宣武医院获得。将细胞接种于涂有 0.2%明胶(Sigma-Aldrich, MO, USA)的培养瓶中。培养基为无叶酸的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich)中添加 0.1 mM β - 巯基乙醇,非必须氨基酸,2 mM 谷氨酸,15%胎牛血清 (Invitrogen, Carlsbad, USA), 4 mg/L 叶酸 (Sigma-Aldrich) 和 1000 U/mL 白血病抑制因子 (Millipore, Billerica, USA)。将细胞置于 37℃ 恒温, 5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱内培养,每 24 h 更换培养基 1 次。

1.2 叶酸处理小鼠 ESCs

在叶酸正常的培养基中经过三次传代之后,小鼠 ESCs 用多种叶酸浓度的培养基培养。根据叶酸浓度可以分为三组:1) 4 mg/L 叶酸(叶酸正常组, FN); 2) 0.5 mg/L 叶酸(叶酸缺乏组, FD); 3) 0 mg/L 叶酸(无叶酸组, FF)。

1.3 小鼠 ESCs 内叶酸浓度测定

利用竞争性受体结合免疫分析方法测定小鼠 ESCs 内叶酸浓度 (Chemiluminescent Immunoassay Access Immunoassay system II Beckman Coulter, Krefeld, Germany)^[17]。

1.4 小鼠 ESCs DNA 提取

根据 DNA Blood and Cell Culture DNA Kit(QIAGEN, Dusseldorf, Germany)说明书,以 5×10^6 个细胞量提取基因组。通过琼脂糖凝胶电泳检测到无 RNA 污染。DNA 样本 A260:A280 比约为 1.8^[17]。

1.5 重亚硫酸盐处理

按照 Methylamp DNA Modification Kit (Epigentek, NY, USA) 说明书将 500 ng 的样本基因组 DNA 进行重亚硫酸盐处理,其原理为单链 DNA 的未甲基化胞嘧啶 C 可被重亚硫酸盐脱去氨基而转变为尿嘧啶 U, 而 5mC 不能被修饰, 仍保持为 5mC。用无甲基化的 PCR 产物进行重亚硫酸盐转化的质量控制。本试剂盒 CT 转化效率高达 99%以上。

1.6 甲基化检测和分析

利用 Sequenom MassARRAY platform (CapitalBio, Beijing, China)来检测 Nespas DMR 区甲基化水平。我们实验室已经利用重亚硫酸盐测序的方法验证了该方法的系统稳定性。该方法是使用基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱分析技术 (MALDI-TOF) 联合 RNA 碱基特异性裂解 (MassCLEAVE) 检测数据,采用 EpiTYPER 软件分析并输出结果质谱分析。运用 Methprimer (<http://epidesigner.com>)设计 PCR 引物。在正向引物 5' 端加入 10 mer Taq, 用于平衡 PCR 反应,反向引物 5' 端加入 T7-Promoter 序列,用于后续的体外转录。PCR 扩增, SAP 反应消除 PCR 产物中剩余的 dNTP, 以减少其对质谱检测的干扰。

MassCLEAVE 反应将 PCR/SAP 产物翻转录成 RNA, 体系中 RNase A 将 RNA 切成小片段。其中, RNase A 分为两种,即识别 "U/T" 的 RNase A 和识别 "C" 的 RNase A。本实验选择识别 "U/T" 的 RNase A。将加入树脂的 384 孔板放入加样仪中,开始加样前先分别用乙醇和超纯水将加样针清洗两次。然后设置参数,包括:进针时间、进针深度、点样时间、点样速度等,参数设置完成后即可在芯片上点样。将目标序列的相关信息输入 EpiTYPER 软件中。点样完成后,将芯片至于质谱仪中,即可根据片段中 C/T 碱基分子量差进行甲基化分析。由 EpiTyper software version 1.0 (Sequenom, San Diego, CA) 得出质谱甲基化比率。

1.7 统计学分析

用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,单因素方差分析用来比较 FF, FD 与 FN 之间 Nespas DMR 启动子区, 外显子区和内含子区的甲基化差异。Pearson 相关系数用来检测叶酸水平与 Nespas DMR 启动子区, 外显子区和内含子区的甲基化水平之间的相关性。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 ESCs 内叶酸浓度

小鼠 ESCs 细胞内的叶酸浓度如下图(图 1), 结果显示, FF 组小鼠 ESCs 细胞内叶酸浓度为 0.32 ng/10⁶ cell, 显著低于 FD 组的 1.08 ng/10⁶ cell 与 FN 组的 2.15 ng/10⁶ cell (P < 0.05)。

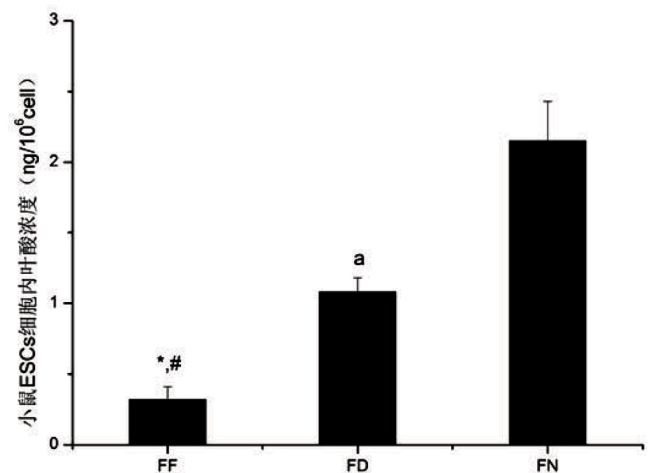


图 1 小鼠 ESCs 细胞内叶酸浓度

*: FF 与 FD 组之间差异有统计学意义; #: FF 与 FN 组之间差异有统计学意义; a: FD 组与 FN 组之间差异有统计学意义。P < 0.05。

Fig.1 Folate content of mouse ESCs

*: FF VS FD; #: FF VS FN; a: FD VS FN. P < 0.05.

2.2 叶酸缺乏对 Nespas DMR 区甲基化的影响

如表 1 所示,小鼠 ESCs 中 Nespas DMR 启动子区,外显子区和内含子区的甲基化水平在 FF 组显著低于 FD 组与 FN 组 (P < 0.05),但是在 FD 组与 FN 组之间没有显著差异。图 2 显示在 FF 组、FD 组以及 FN 组中 Nespas DMR 启动子区,外显子区和内含子区内各个 CpG 位点甲基化水平。可见该区域内各

位点甲基化水平呈现相同的趋势,即 FF 组各个 CpG 位点甲基化水平显著低于 FD 组与 FN 组 ($P < 0.05$),但是 FD 组与 FN 组各个 CpG 位点甲基化水平没有显著差异。

2.3 Nespas DMR 区甲基化水平与叶酸水平的相关性

结果显示叶酸浓度与 Nespas DMR 启动子区和内含子区的甲基化水平正相关($P < 0.05$),但是 Nespas DMR 外显子区与叶酸浓度没有相关性。

3 讨论

在本研究中,我们发现叶酸缺乏导致小鼠 ESCs 细胞内叶酸浓度降低,并且叶酸缺乏影响 ESCs 中 Nespas DMR 启动子区、外显子区和内含子区甲基化修饰的建立。同时,我们发现在 Nespas DMR 中启动子区与内含子区甲基化水平与细胞内叶酸

表 1 不同浓度叶酸培养小鼠 ESCs 中 Nespas DMR 启动子区,外显子区和内含子区平均甲基化水平($\%, \bar{X} \pm SE$)

Table 1 Methylation levels of promoter region, exon region and intron region within Nespas DMR in mouse ESCs cultured in medium with various folate concentrations($\%, \bar{X} \pm SE$)

PVA	Nespas DMR		
	Promoter region	Exon region	Intron region
FF	23.6 $\pm$ 1.6 ^{*,#}	22.6 $\pm$ 3.1 ^{*,#}	21.1 $\pm$ 1.4 ^{*,#}
FD	29.7 $\pm$ 2.3	30.9 $\pm$ 7.6	26.9 $\pm$ 1.5
FN	32.3 $\pm$ 2.3	29.6 $\pm$ 4.1	29.4 $\pm$ 3.5

注: *:FF 与 FD 组之间差异有统计学意义; #:FF 与 FN 组之间差异有统计学意义。 $P < 0.05$ 。

Note: *:FF VS FD; #:FF VS FN; a:FD VS FN. $P < 0.05$ 。

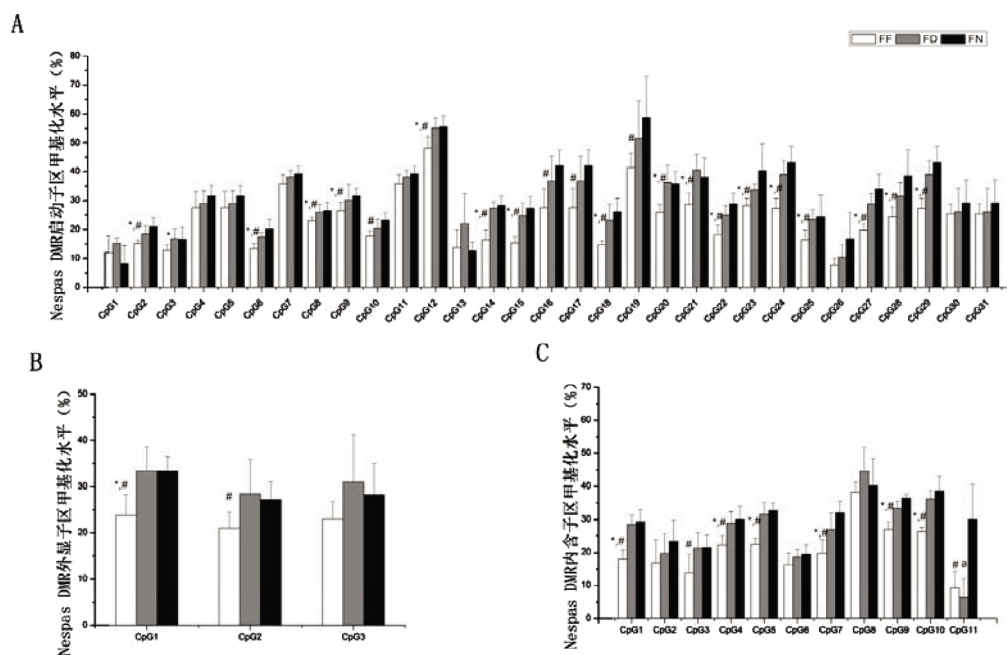


图 2 Nespas DMR 区 CpG 位点甲基化水平($\%$, 平均值 $\pm$ 标准差)

A: Nespas DMR 启动子区; B: Nespas DMR 外显子区; C: Nespas DMR 内含子区。 *:FF 与 FD 组之间差异有统计学意义; #:FF 与 FN 组之间差异有统计学意义; a:FD 组与 FN 组之间差异有统计学意义。 $P < 0.05$ 。

Fig.2 The methylation levels of CpG sites within Nespas DMR ($\%, \bar{X} \pm SE$)

A: promoter region of Nespas DMR; B: exon region of Nespas DMR; C: intron region of Nespas DMR.

*:FF VS FD; #:FF VS FN; a:FD VS FN. $P < 0.05$ 。

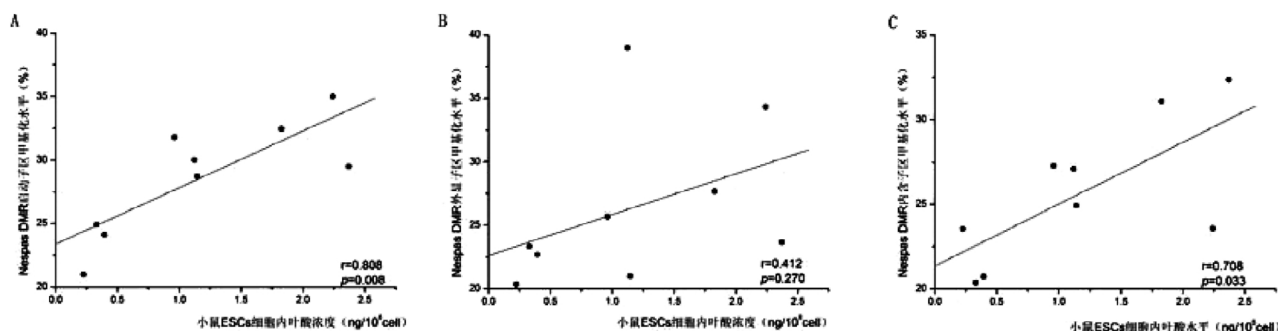


图 3 Nespas DMR 启动子区,外显子区和内含子区甲基化水平与叶酸水平之间的相关性

A: Nespas DMR 启动子区; B: Nespas DMR 外显子区; C: Nespas DMR 内含子区。

Fig.3 The relevance between the methylation levels and folate content

A: promoter region of Nespas DMR; B: exon region of Nespas DMR; C: intron region of Nespas DMR.

水平存在显著的正相关。这些结果表明叶酸缺乏可能通过改变 Nespas 的甲基化水平,引起印记状态的异常,最终影响早期胚胎发育,从而导致疾病或出生缺陷的发生。

DNA 甲基化在胚胎发育的早期建立,并且可以受到营养不良的影响,如叶酸,维生素 B12 缺乏等^[18]。印记基因受到 DNA 甲基化的调节,对胚胎发育早期影响 DNA 甲基化模式建立的营养不良非常敏感^[19,20]。一旦 gDMR 在亲代生殖细胞内被差异甲基化,印记状态即被保持,必须要经受住受精后的去甲基化和胚胎发育中的重新甲基化才能在甲基化转移酶 DNMT1 作用下使基因正常印记^[21]。因此我们选择发育早期细胞-小鼠 ESCs 作为研究叶酸缺乏对印迹基因 DMR 区甲基化水平影响的细胞模型。

叶酸缺乏可以引起印记基因的甲基化水平降低^[22]。在本研究中,我们用不同叶酸浓度的培养基培养小鼠 ESCs,利用化学发光免疫分析法测定细胞内叶酸浓度,得到无叶酸组细胞内叶酸浓度显著低于叶酸缺乏组与正常叶酸组。我们进一步利用 Massarray 技术平台检测 Nespas DMR 的甲基化水平,结果发现低叶酸导致 ESCs 中 Nespas DMR 启动子区、外显子区和内含子区甲基化水平降低。叶酸作为甲基化的供体,在早期胚胎发育过程中起非常重要的作用,研究显示叶酸缺乏可以导致基因组甲基化降低,并且可以引起低出生体重儿、胎儿宫内发育迟缓(IUGR)、神经管畸形(NTDs)等现象的发生^[3,4,23,24]。有研究表明发育早期由叶酸等环境营养引起的基因组甲基化修饰的变化更容易发生在印记区域^[18]。我们的前期研究也发现在叶酸缺乏状态下,小鼠 ESCs 的基因组甲基化水平明显降低^[17]。在本研究中我们进一步发现叶酸缺乏导致印记基因 Nespas 的 DMR 区域甲基化异常。已知 Nespas 印迹基因位于小鼠第 2 号染色体和人类第 20 号染色体,具有高度的保守性。Nespas 是 Nesp 的反义转录本,其编码的 Nespas non-coding RNA 调控 Nesp 的转录^[25]。Nesp 编码一种神经内分泌蛋白--Nesp55,参与调节胚胎的生长发育过程^[16]。DMR 区是 Nespas 的核心调控区,DNA 甲基化是 DMR 区最重要的调控机制之一,其甲基化变化影响 Nespas 的印记状态,影响 Nespas non-coding RNA 的表达。研究显示异常的 Nespas non-coding RNA 引起 Nesp55 表达状态的变化^[26,27],导致出生前后生长发育的异常^[16]。这些研究成果与我们的结果相一致,说明叶酸缺乏的小鼠 ESCs 中印记基因 Nespas 发生了异常,并可能通过改变 Nespas non-coding RNA,影响胚胎发生。Nespas DMR 是一段分布广泛的种系母源印迹区域,Christine M Williamson 等发现 Nespas DMR 分布于 Nespas 印迹基因的启动子区,外显子区和内含子区^[13]。为了进一步说明叶酸浓度与 Nespas DMR 甲基化水平之间的关系,我们利用 Pearson correlation coefficient 分析了小鼠 ESCs 细胞内叶酸浓度与 Nespas DMR 启动子区,外显子区和内含子区的甲基化水平之间的相关性,结果显示启动子区与内含子区的甲基化水平与细胞内叶酸浓度存在显著的正相关,说明叶酸缺乏直接影响了 Nespas DMR 甲基化修饰的建立。已知 DMR 区是印记基因转录调控的关键区域,并且启动子区作为 RNA 聚合酶特异性识别和结合的 DNA 序列,控制基因的转录与表达。本研究发现作为基因调控主要区域的启动子区甲基化水平与叶酸浓度之间存在显著的正相关,提示叶酸缺乏可能影响 Nespas

non-coding RNA 的转录表达,并且 Christine M Williamson 等证实 Nespas DMR 敲除导致 Nespas 基因表达缺失,同时导致 Nesp 表达显著升高,该 DMR 区域调控的 Nespas 可以影响 Nesp 的转录表达^[13]。因此,叶酸缺乏可能直接影响了 Nespas DMR 的甲基化修饰,可能通过影响 Nespas 的转录与表达,进而在生长发育过程中起作用。

本研究从胚胎发育的角度,初步探讨了叶酸缺乏等营养因素改变对 Nespas 印记基因 DMR 区甲基化的影响,并结合文献对该 DMR 区调控的基因的功能研究结果,推测 Nespas 在叶酸缺乏的胚胎发育起始阶段可能的作用,即 Nespas 通过影响 Nesp55 的转录表达而影响胚胎的生长发育。随着胚胎发育的进行,Nespas 的印记状态是否变化,及该过程中所起的作用,是我们下一步的研究目标。总之,本研究为叶酸缺乏影响胚胎发育提供了一个新的思路。

参考文献(References)

- [1] Beaudin, A.E., E.V. Abarinov, O. Malysheva, et al. Dietary folate, but not choline, modifies neural tube defect risk in Shmt1 knockout mice [J]. *Am J Clin Nutr*, 2012, 95(1): 109-114
- [2] Beaudin, A.E., E.V. Abarinov, D.M. Noden, et al. Shmt1 and de novo thymidylate biosynthesis underlie folate-responsive neural tube defects in mice[J]. *Am J Clin Nutr*, 2011, 93(4): 789-798
- [3] Beaudin, A.E., C.A. Perry, S.P. Stabler, et al. Maternal Mthfd1 disruption impairs fetal growth but does not cause neural tube defects in mice[J]. *Am J Clin Nutr*, 2012, 95(4): 882-891
- [4] Scholl, T.O, W.G. Johnson. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy[J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(5 Suppl): 1295S-1303S
- [5] Burke, G., K. Robinson, H. Refsum, et al. Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels [J]. *N Engl J Med*, 1992, 326(1): 69-70
- [6] Wang, L., F. Wang, J. Guan, 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
- [7] Czeizel, A.E. Periconceptional folic acid and multivitamin supplementation for the prevention of neural tube defects and other congenital abnormalities [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2009, 85(4): 260-268
- [8] Czeizel, A.E, I. Dudas. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation[J]. *N Engl J Med*, 1992, 327(26): 1832-1835
- [9] Bower, C., H. D'Antoine, F.J. Stanley. Neural tube defects in Australia: trends in encephaloceles and other neural tube defects before and after promotion of folic acid supplementation and voluntary food fortification[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2009, 85(4): 269-273
- [10] Bull, C.F., G. Mayrhofer, D. Zeegers, et al. Folate deficiency is associated with the formation of complex nuclear anomalies in the cytokinesis-block micronucleus cytome assay [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2012, 53(4): 311-323
- [11] Ivanova, E., J.H. Chen, A. Segonds-Pichon, et al. DNA methylation at differentially methylated regions of imprinted genes is resistant to developmental programming by maternal nutrition[J]. *Epigenetics*, 2012, 7(10): 1200-1210

- atherosclerosis: a potential drug target for plaque stabilization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(12): 2787-2791
- [14] Singh R, Xiang Y, Wang Y, et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice[J]. *Clin Invest*, 2009, 119(11): 3329-3339
- [15] Szanto I, Kahn C R. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(5): 2355-2360
- [16] Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages *Cell*, 2004, 119: 753-766
- [17] Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. *Nature*, 2009, 458: 1131-1135
- [18] Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, et al. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy[J]. *Science*, 2005, 307: 727-731
- [19] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 2491-2502
- [20] Matsunaga K, Saltoh T, Tabata K, et al. Two Beclin1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 385-396
- [21] Iwai-Kanai E, Yuan H, Huang C, et al. A method to measure cardiac autophagic flux in vivo[J]. *Autophagy*, 2008, 4: 322-329

(上接第 2204 页)

- [12] Ishida, M. and G.E. Moore. The role of imprinted genes in humans [J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(4): 826-840
- [13] Williamson, C.M., M.D. Turner, S.T. Ball, et al. Identification of an imprinting control region affecting the expression of all transcripts in the *Gnas* cluster[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(3): 350-355
- [14] Williamson, C.M., S.T. Ball, W.T. Nottingham, et al. A cis-acting control region is required exclusively for the tissue-specific imprinting of *Gnas*[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(8): 894-899
- [15] Bartolomucci, A., R. Possenti, S.K. Mahata, et al. The extended granin family: structure, function, and biomedical implications [J]. *Endocr Rev*, 2011, 32(6): 755-797
- [16] Eaton, S.A., T. Hough, R. Fischer-Colbrie, et al. Maternal inheritance of the *Gnas* cluster mutation Ex1A-T affects size, implicating *NESP55* in growth[J]. *Mamm Genome*, 2013, 24(7-8): 276-285
- [17] Chang, S., L. Wang, Y. Guan, et al. Long interspersed nucleotide element-1 hypomethylation in folate-deficient mouse embryonic stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(7): 1549-1558
- [18] Waterland, R.A. and R.L. Jirtle. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases[J]. *Nutrition*, 2004, 20(1): 63-68
- [19] Ghoshal, K., X. Li, J. Datta, et al. A folate-and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats[J]. *J Nutr*, 2006, 136(6): 1522-1527
- [20] Pogribny, I.P., A.R. Karpf, S.R. James, et al. Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet[J]. *Brain Res*, 2008, 1237: 25-34
- [21] Howell, C.Y., T.H. Bestor, F. Ding, et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene [J]. *Cell*, 2001, 104(6): 829-838
- [22] Crider, K.S., T.P. Yang, R.J. Berry, et al. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role[J]. *Adv Nutr*, 2012, 3(1): 21-38
- [23] 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
- [24] 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
- [25] Plagge, A., E. Gordon, W. Dean, et al. The imprinted signaling protein *XL alpha s* is required for postnatal adaptation to feeding[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(8): 818-826
- [26] Williamson, C.M., S.T. Ball, C. Dawson, et al. Uncoupling antisense-mediated silencing and DNA methylation in the imprinted *Gnas* cluster[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(3): e100134.
- [27] Williamson, C.M., J.A. Skinner, G. Kelsey, et al. Alternative non-coding splice variants of *Nespas*, an imprinted gene antisense to *Nesp* in the *Gnas* imprinting cluster[J]. *Mamm Genome*, 2002, 13(2): 74-79