

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.07.009

组织叶酸检测方法的建立及应用 *

常韶燕¹ 李佰一¹ 姚秀英² 刘鑫丽² 王 理^{1△}

(1 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;

2 中国人民解放军二六三医院 产科病区与妇科学 北京 101100)

摘要 目的:采用目前常用的化学发光法检测组织叶酸,探索不同叶酸前处理,寻求合适的检测组织叶酸的实验方法。并将优化好的方法应用于叶酸缺乏小鼠模型的检测。**方法:**通过化学发光法检测组织叶酸含量,首先将一定量的组织放入合适的 buffer 中,匀浆器匀浆后,通过超声或煮沸处理样本,离心后,得到上清样本,建立标曲和质控后,进行上机测定。该方法中我们通过探讨不同的 buffer(包括 PBS、Lysis 和 Tris-base 盐溶液)处理组织叶酸,和不同的处理条件(包括是否煮沸及煮沸时间、样本处理时间等),探讨该方法检测组织叶酸最优化条件;并应用该方法进行小鼠叶酸缺乏模型中各组织叶酸含量的检测。**结果:**我们选择雄鼠肝组织进行叶酸检测,分别用 PBS、Lysis 和 Tris-base 盐溶液进行样本前处理,结果发现同样的处理条件下,如不煮沸条件下,Tris-base 盐溶液(38.72 ng/mg)>PBS(15.68 ng/mg)>Lysis(11.9 ng/mg),提示 Tris-base 盐溶液可能有助于叶酸的稳定,防止降解。同时,我们探讨煮沸对叶酸检测结果的影响,结果发现同一种前处理下(如 Tris-base),不煮沸(38.72 ng/mg)>煮沸 1 分钟(36.36 ng/mg)>煮沸 3 分钟(33.28 ng/mg)>煮沸 5 分钟(30.72 ng/mg),说明叶酸含量随着煮沸时间的延长逐渐降低。此外,我们还对叶酸检测结果的重复性和稳定性进行了评估,结果发现不煮沸条件下,叶酸结果重复性很好,但随着时间延长稳定性会逐渐下降。因此,我们选择了 Tris-base 盐溶液进行前处理,条件选择不煮沸和立即检测来减少因样本处理问题产生的误差。我们用该方法检测了叶酸缺乏小鼠模型的组织叶酸含量,结果发现肝组织 18.81 ng/mg 降为 8.46 ng/mg,脑组织从 0.37 ng/mg 下降为 0.19 ng/mg,脾脏组织从 1.53 ng/mg 下降为 0.26 ng/mg,肺组织从 0.47 ng/mg 下降为 0.13 ng/mg,肾脏组织从 2 ng/mg 下降为 0.9 ng/mg,心脏组织从 0.33 ng/mg 下降为 0.06 ng/mg 说明饮食叶酸是体内叶酸的主要来源,其缺乏可能导致多种组织叶酸代谢异常。**结论:**组织叶酸化学发光法检测条件优化为 Tris-base 盐溶液进行前处理,条件选择不煮沸,并将样本立即进行检测。我们用该方法检测小鼠叶酸缺乏模型发现低叶酸饮食能显著降低各组织的叶酸含量,可能对生长发育造成潜在的影响。

关键词:叶酸; Tris-base 盐溶液; PBS; Lysis**中图分类号:**R33;O657;Q563.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)07-1246-05

Establishment and Application of Tissue Folic Acid Detection Method*

CHANG Shao-yan¹, LI Bai-yi¹, YAO Xiu-ying², LIU Xin-li², WANG Li^{1△}

(1 Beijing Municipal Key Laboratory of Child Development and Nutriomics, Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China;

2 Department of obstetrics and gynecology, PLA army general hospital 263th Clinical Department, Beijing, 101100, China)

ABSTRACT Objective: To find an appropriate experimental method for detecting folic acid in tissues, we selected the method of chemiluminescence (CL) and explored different pretreatments of folic acid. Furthermore, we also explored the application of this method in folic acid deficiency mice model. **Methods:** The folic acid content in tissues was detected by chemiluminescence method. Firstly, a certain amount of tissues were put into a suitable buffer. After homogenizing, the samples were treated by ultrasound or boiling. The supernatant samples were obtained after centrifugation. The samples were determined by the AccessII analysis platform after the establishment of curvature and quality control. In this method, we investigated the optimal conditions for detecting folic acid in tissues by different buffer treatments (including PBS, Lysis and Tris-base salt solution) and different treatment conditions (including boiling time, sample processing time, etc.). Using this method, we detection of folic acid content of various tissues in the folic acid-deficient mouse model. **Results:** Liver tissues of male mice were selected and pretreated with PBS, Lysis and Tris-base salt solution respectively. The results showed that under the same treatment conditions, without boiling, the folic acid content in Tris-base salt solution group (38.72 ng/mg) was the highest than in PBS (15.68 ng/mg) and Lysis (11.9 ng/mg) suggesting that Tris-base salt solution may contribute to the stability of folic acid and prevent its degradation. Meanwhile, we investigated the effect of boiling on folic acid concentration. The results showed that under the same pretreatment (such as Tris-base), the content of folic acid gradually decreased with the prolongation of boiling time, with no boiling of 38.72 ng/mg, boiling for 1 minute of 36.36 ng/mg, boiling for 3 minutes of 33.28 ng/mg, boiling for 5 minutes of 30.72

* 基金项目:北京市属医学科研院所公益发展改革与发展专项(京医研 2016-4);

北京市医院管理局儿科学科协同发展中心专项(XTZD20180402)

作者简介:常韶燕(1980-),助理研究员,主要研究方向:营养与代谢,E-mail: changshayan_2001@163.com

△ 通讯作者:王理(1979-),研究员,主要研究方向:营养与代谢,E-mail: lily_wang@yeah.net,电话:010-85695585

(收稿日期:2018-11-28 接受日期:2018-12-23)

ng/mg. In addition, we also evaluated the repeatability and stability of folic acid test results. The results showed that the repeatability of folic acid test was good under the condition of no boiling, but the stability would gradually decrease with time. Therefore, we used Tris-base salt solution for pretreatment, under the condition of non-boiling and immediate detection to reduce the error caused by sample preprocessing. Folic acid content in tissues of folic acid deficient mice was determined by this method. The results showed that folic acid content in tissues of folic acid deficient mice was significantly lower than that of normal mice, with 18.81 ng/mg decreasing to 8.46 ng/mg of liver, 0.37 ng/mg decreasing to 0.19 ng/mg of brain, 1.53 ng/mg decreasing to 0.26 ng/mg of spleen, 0.47 ng/mg decreasing to 0.13 ng/mg of lung, 2 ng/mg decreasing to 0.9 ng/mg of kidney, 0.33 ng/mg decreasing to 0.06 ng/mg of heart, indicating that folic acid in diet was the main source of folic acid in vivo and folic acid deficiency may cause folic acid metabolism abnormalities in a variety of tissue. **Conclusions:** The chemiluminescence method detected tissue folic acid is optimized to pretreat with Tris-base salt solution, and the condition is not boiling, and the samples are detected immediately. Using the method, we detected the tissue of folic acid-deficient mouse model and found that low folic acid diet can significantly reduce the folic acid content in various tissues, which may have a potential impact on growth and development.

Key words: Folic acid; Tris-base salt solution; PBS; Lysis

Chinese Library Classification(CLC): R33; O657; Q563.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)07-1246-05

前言

叶酸是人体必需的B族维生素,其生理功能主要包括两个方面:1)作为一碳代谢转移酶系的辅酶,起传递一碳单位的作用,参与DNA与组蛋白等甲基化的表观修饰^[1,2];2)参与嘌呤和胸腺嘧啶的合成,进一步合成DNA或RNA^[3,4];此外,还参与氨基酸等的代谢过程。因此叶酸参与许多重要的生化过程,在细胞增殖分化和凋亡及组织器官生长过程中起至关重要的作用,直接影响机体发育或疾病的进程^[5,6]。动物实验和流行病学研究显示叶酸缺乏与多种先天发育畸形密切相关,包括神经管畸形(NTD)、先天性心脏病(CHD)和白血病等^[7-10]。不仅如此,叶酸还与肿瘤和神经精神方面的疾病密切相关^[11,12]。叶酸缺乏目前成为一个重要的保健问题,而补充叶酸对出生缺陷的预防作用和对疾病的干预作用也已经得到了广泛认可。因此探索叶酸缺乏在各器官组织中的作用及机制,对于正确合理补充叶酸和疾病的防治有重要意义。目前检测叶酸的方法有多种,包括微生物法、化学发光法、核素放射免疫法、HPLC法等^[13-15]。由于体内叶酸有多种存在形式,这些方法均有一定的局限性,而且这些方法大多针对血液中的叶酸,基础研究中更多需要测定组织叶酸,以便于更准确、客观地反应叶酸的缺乏和利用情况。微生物法是目前国际上公认的检测叶酸的精标准,虽然该方法有高灵敏度和结果准确的优点,但也存在很多局限,如整个实验周期长,结果重复性差等,而且组织成分复杂,更增加了该方法应用的可能性^[16]。化学发光法是目前应用相对较多的检测方法,但多用于临床检测血清样本中的叶酸含量。但由于该方法前处理简单,可操作性强,因此我们在此基础上探索了组织叶酸的测定方法,并经多次验证,最终确定了该方法的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用试剂:叶酸试剂盒(a14208),底物(81906),清洗缓冲液(a16792),定标液(a14207),质控品(371、372、373)。仪器分析平台:化学发光免疫酶联免疫分析系统II;Beckman Coulter, Krefeld, 德国(Chemiluminescent Immunoassay

Access Immunoassay System II; Beckman Coulter, Krefeld, Germany)。

1.2 方法

1.2.1 叶酸测定 1) 原理 Access Folate 测定是一种竞争结合受体测定^[17,18]。在血清、组织等样本经过处理后,可以将叶酸从内生结合蛋白中释放出来。叶酸结合蛋白、小鼠抗叶酸结合蛋白、叶酸-碱性磷酸酶结合物和山羊抗小鼠捕获抗体与顺磁性微粒一起添加到反应管中。样本中的叶酸与叶酸-碱性磷酸酶结合物争夺一定数量叶酸结合蛋白上的结合位点。产生的复合物再通过小鼠抗叶酸结合蛋白与固相结合。在反应管内温育完成后,结合在固相上的物质将置于一个磁场内被吸住,而未结合的物质被冲洗除去。然后将化学发光底物 Lumi-Phos*530 添加到反应管内,由照度计对反应中所产生的光进行测定。所产生光的量与样本内叶酸的浓度成反比。样本内分析物的量由所储存的多点校准曲线来确定。2) 标准曲线的绘制分别用 S0、S1、S2、S3、S4、S5、S6 (0 ng/mL、1.0 ng/mL、2.5 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL 和 20.0 ng/mL) 六个浓度进行标曲拟合。3) 质控 每次样本检测前,必须检测三个商品化的质控品,分为低中高三个浓度,即 3.83 ng/mL、9.98 ng/mL、14.6 ng/mL。

4) 样品测定 (1) 样品称取:取雄鼠肝脏 0.03-0.06 mg, 肾胃脾分别为 0.3 mg, 肠心脑肺肌胎盘各为 1.5-2.5 mg; (2) 样品前处理:加 buffer 溶液 1 mL 于 EP 管中,匀浆器匀浆,超声,条件为超声 10 秒,间隔 10 秒,共 3 分钟。将超声后的样本进行离心,条件为 12000 rpm, 4℃, 3 分钟,取上清; (3) 样品测定:将离心后的上清取 200 μ L 进行测定。

1.2.2 叶酸缺乏小鼠模型的建立 首先我们选择 6 周龄的雌性小鼠(C57BL/6)进行研究,根据 AIN-93 的标准合成无叶酸饲料^[19],将这些小鼠分别用无叶酸和正常饲料喂养 4 周^[20,21]。这些小鼠饲养环境为 SPF 级,规律的 12 小时白天/晚上节律,恒温控制。4 周后雌鼠首先进行眼球采血,然后断颈处死,收集各组组织用于叶酸检测。

1.3 统计学分析

本研究使用 SPSS 16.0 软件 (McGraw-Hill Inc, New York, NY) 对数据进行分析。单样本 T 检验评价叶酸缺乏组和正常组

之间的差异。数据以平均值和标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同前处理的叶酸测定结果

化学发光法检测的操作简单便捷和高灵敏度使得该方法在临床应用中广泛使用,但多用于检测血液中叶酸含量。为了检测组织叶酸水平,我们分析了该方法中可能对叶酸产生影响的参数,发现 buffer 和处理条件属于可变参数,对叶酸测定结果的影响最大。目前,常用的叶酸测定前处理 buffer 大多是 Tris-base 盐溶液和磷酸盐缓冲液(PBS)两种,但针对这两种 buffer 对叶酸测定结果的影响没有研究进行比对过。本研究针对叶酸前处理对测定结果的影响,比对了三种 buffer,包括 Tris-base 盐溶液、红细胞裂解液(Lysis)和 PBS。我们选择雄鼠的肝组织进行研究,同一种样本均进行三次测量,结果发现相同条件下,三种 buffer 测定结果差异比较明显,其中 Tris-base 盐溶液叶酸测定结果明显高于其他两组(表 1),因此我们选择 Tris-base 盐溶液进行前处理。

叶酸对热不稳定,但加热能够释放出更多形式的叶酸,因此我们分析了叶酸前处理中是否煮沸及煮沸时间对叶酸测定结果的影响。结果发现叶酸测定浓度随着煮沸时间的延长逐渐下降(表 1),表明叶酸对热不稳定,煮沸不利于叶酸的检测。综合前期的结果,我们选择叶酸测定的条件为首先用 Tris-base 盐溶液进行样本前处理,之后样本不煮沸直接进行超声,离心后取上清进行叶酸测定。

2.2 叶酸测定结果的稳定性和重复性分析

为了探讨叶酸测定结果的重复性,我们对同一种样本,分别进行前处理后,三次重复测定后进行比对。结果发现两次前处理的测定结果很接近(表 2),说明叶酸测定结果的重复性很好。

同时我们将前处理后的上清溶液在不同的时间点进行检测,结果发现不煮沸条件下,2 天后的上清中叶酸含量明显下降,而煮沸条件下,叶酸含量没有明显差别,说明叶酸在不煮沸条件下稳定性比较差,而煮沸条件下反而相对稳定,提示不煮沸条件下,叶酸浓度受处理时间的影响较大,因此我们在不煮沸条件下对叶酸的检测应立即进行,减少叶酸的转化或降解,保证测定结果的可靠性。

2.3 正常雄鼠和叶酸缺乏小鼠模型中雌鼠各组织的叶酸检测结果

我们用前期优化好的组织叶酸处理条件,首先检测了正常雄鼠中各组织叶酸含量,包括肝、心、脾、肺、肾、脑。结果发现各组织中叶酸含量明显不同,肝中叶酸含量最高(34.22 ± 20.7 ng/mg),其次为肾(2.11 ± 0.02 ng/mg)和脾(1.18 ± 0.05 ng/mg),心(0.34 ± 0.01 ng/mg)、肺(0.33 ± 0.02 ng/mg)和脑(0.34 ± 0.03 ng/mg)中叶酸含量最低(图 1)。

我们用叶酸缺乏的饲料喂养小鼠,4 周后,测定雌鼠中各组织中的叶酸含量。结果发现与正常组相比,缺乏组中各组织中叶酸含量均明显下降,分别为肝脏组织从正常组的 18.81 ng/mg 降为 8.46 ng/mg,脑组织从 0.37 ng/mg 下降为 0.19 ng/mg,脾脏组织从 1.53 ng/mg 下降为 0.26 ng/mg,肺组织从 0.47 ng/mg 下降为 0.13 ng/mg,肾脏组织从 2 ng/mg 下降为 0.9 ng/mg,心脏组织从 0.33 ng/mg 下降为 0.06 ng/mg(图 2)。

表 1 Tris-base、Lysis 和 PBS 前处理叶酸测定结果比较 ($\bar{x} \pm sd$)

Table 1 Comparison of the results of folic acid pretreatment between the pre-processing of Tris-base and Lysis and PBS ($\bar{x} \pm sd$)

Pretreatment conditions	Tris-base (ng/mg)	PBS (ng/mg)	Lysis (ng/mg)
Not boiling	38.72 ± 0.05	15.68 ± 0.06	11.9 ± 0.04
Boiling 1 min	36.36 ± 0.06^a	15.4 ± 0.06^a	11.02 ± 0.06^a
Boiling 3 min	33.28 ± 0.08^b	14.64 ± 0.07^b	9.1 ± 0.05^b
Boiling 5 min	30.72 ± 0.11^c	13.36 ± 0.09^c	8.8 ± 0.09^c

Note: a, $P < 0.05$ Boiling 1 min group compared with Not boiling; b, $P < 0.05$ Boiling 3 min group compared with Not boiling; c, $P < 0.05$ Boiling 5 min group compared with Not boiling.

表 2 Buffer 前处理不同测量批次的重复性比较 ($\bar{x} \pm sd$)

Table 2 Repeatability comparison of different batches of Buffer pre-processing ($\bar{x} \pm sd$)

Pretreatment conditions	Tris-base pre-processing	
	Sample 1st (ng/mg)	Sample 2nd (ng/mg)
Not boiling	38.72 ± 0.04	38.94 ± 0.06
Boiling 1 min	36.36 ± 0.05^a	36.06 ± 0.04^a
Boiling 3 min	33.28 ± 0.08^b	33.19 ± 0.06^b
Boiling 5 min	30.72 ± 0.06^c	31.43 ± 0.09^c

Note: a, $P < 0.05$ Boiling 1 min group compared with Not boiling; b, $P < 0.05$ Boiling 3 min group compared with Not boiling; c, $P < 0.05$ Boiling 5 min group compared with Not boiling.

3 讨论

本研究我们采用化学发光法检测组织中的叶酸含量。我们选取了小鼠肝组织,通过不同的前处理,分析比对叶酸水平的

表 3 Buffer 前处理的不同测量时间点的稳定性比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Stability comparison of different time points for Buffer pre-processing($\bar{x} \pm s$)

Pretreatment conditions	Tris-base pre-processing	
	Supernatant (ng/mg)	Supernatant after 2days (ng/mg)
Not boiling	38.72 $\pm$ 0.04	15.84 $\pm$ 0.05
Boiling 1 min	36.36 $\pm$ 0.05a	32.12 $\pm$ 0.04a
Boiling 3 min	33.28 $\pm$ 0.08 ^b	29.16 $\pm$ 0.06 ^b
Boiling 5 min	30.72 $\pm$ 0.06 ^c	27.82 $\pm$ 0.08 ^c

Note: a, $P < 0.05$ Boiling 1 min group compared with Not boiling; b, $P < 0.05$ Boiling 3 min group compared with Not boiling; c, $P < 0.05$ Boiling 5 min group compared with Not boiling.

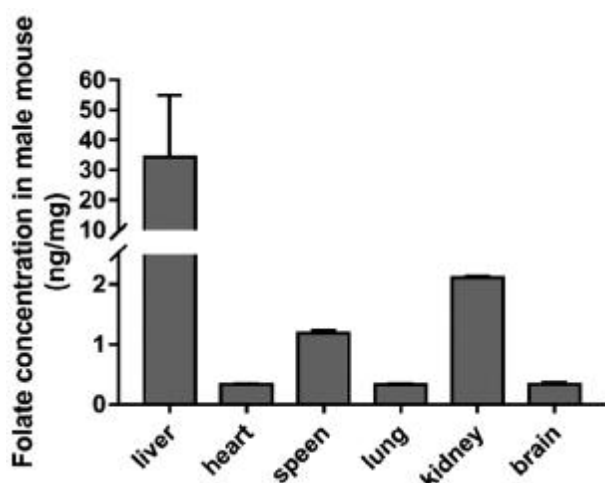


图 1 雄鼠各组织中的叶酸含量

Fig.1 Folic acid content in tissues of male mice

差异,并在此基础上分析验证了测量结果的稳定性和重复性。这一研究为更精确地分析组织叶酸的含量提供了实验依据,有

助于分析各组织对叶酸的吸收和利用情况。我们运用该方法检测了雄鼠中各组织的叶酸含量,同时我们检测了叶酸缺乏的小鼠模型中各组织的叶酸含量。

叶酸在酸性和过碱性的环境中破坏严重,中性或偏碱性环境中相对稳定^[15],根据这一特点,目前研究样本大多采用磷酸盐缓冲液 PBS 和偏碱性的 Tris-base 溶液进行前处理,但目前为止并没有一种方法对这两种处理试剂的效果进行比对过;而且维生素 C 有助于预防叶酸受到氧化破坏^[22],试剂盒中提供的红细胞 Lysis 中富含维生素 C,因此我们将 Tris-base、PBS 和 Lysis 三种前处理溶液分别进行了研究。结果发现同等条件下,三种试剂的前处理的结果有明显差异,叶酸含量最高的是 Tris-base 溶液,其次是 PBS 缓冲液,最低的是 Lysis,说明三种试剂中 Tris-base 溶液更有助于叶酸的稳定。此外,在加热的情况下结合的叶酸能够部分游离出来,因此叶酸检测以往的研究方法大多采用煮沸法进行处理,但同时叶酸本身对热不稳定,煮沸可能会导致叶酸降解,损失一部分叶酸^[19],我们研究了不同煮沸时间对叶酸浓度的影响,并结合超声代替煮沸法,结果

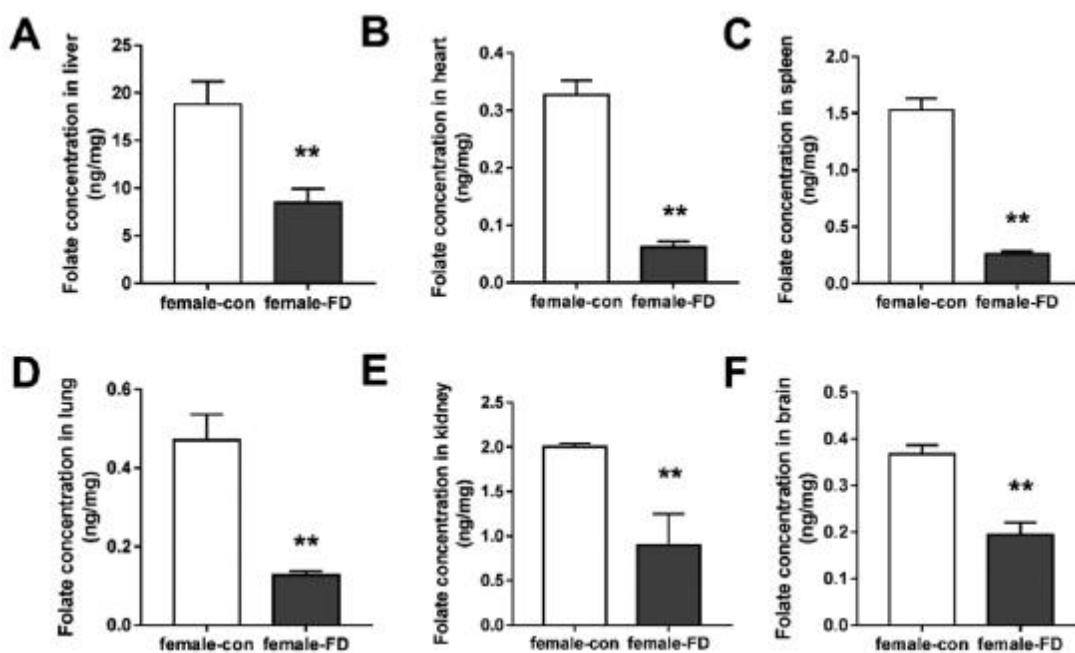


图 2 叶酸缺乏小鼠模型中雌鼠在缺乏组和对照组中各组织的叶酸含量

con, 正常组; FD, 叶酸缺乏组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Fig.2 Folic acid content in the tissues between the deficiency group and the control group in the folic acid-deficient mouse model

con, control group; FD, folic acid-deficient group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

发现不煮沸检测结果的确高于其他组,而且煮沸时间越长,叶酸含量越低,说明超声代替煮沸法是可行的。但是煮沸之后的叶酸含量没有随着时间的延长出现明显改变,说明煮沸后叶酸更稳定;而超声后的叶酸含量随时间延长降低明显,提示我们这种方法对于测量时间要求更严格,需要立即进行检测。

科学研究中叶酸代谢对发育或疾病的影响中,多使用多浓度叶酸干预,通过血清叶酸指示叶酸缺乏或补充程度^[23-25]。由于组织取材方便,而且能更直观地观察叶酸的吸收利用情况,更需要检测各组织中的叶酸含量。因此我用化学发光法检测雄鼠各组织中的叶酸含量,结果发现肝脏叶酸含量最高,其次是脾和肾,最低的是心、肺和脑组织。肝脏是叶酸储存的主要器官,肝脏中叶酸含量的减少表明叶酸缺乏,但在因为肝实质是叶酸贮藏的主要部位,肝脏中叶酸量的减少表明叶酸缺乏^[26],我们的研究结果也证实了这一点。之前的研究分别用化学发光法检测胃组织中的叶酸含量,前处理用的是 PBS^[27],微生物法检测结肠细胞中叶酸水平^[28],这些组织中的叶酸含量都远低于肝脏,这些和我们的研究结果相一致。在此基础上,我们建立了叶酸缺乏的小鼠模型,化学发光法检测结果发现缺乏组中各组织中的叶酸含量明显降低,这一点与我们之前研究的叶酸缺乏的细胞模型相一致^[29,30]。有研究显示母体叶酸水平与胎儿生长发育密切相关^[31],细胞和各组织中低的叶酸水平更直观地反映了叶酸缺乏的细胞和动物模型的建立,为以后研究叶酸对胚胎发育的影响提供很好的实验依据。

叶酸缺乏症与多种临床表现有关,因此准确地评估叶酸的状态非常重要,但常规使用的最佳测试是不确定的。目前在临床实验室中对于叶酸状态的评估多使用的是血清和红细胞叶酸检测^[32]。血清叶酸血清叶酸反映的是体内叶酸的短期水平,因而对于疾病的发生发展能更及时地反应。红细胞叶酸在一定程度上能反映体内较长时间的叶酸情况,因此红细胞叶酸检测能更稳定更精确地反映一段时间内叶酸的改变,较少受饮食等混杂因素一过性的影响^[33,34]。临床多根据不同的情况采用血清和红细胞叶酸指导诊疗或用药等。但组织中的叶酸含量则能更精确地反映体内对叶酸的吸收利用情况,同时对某种特定组织中叶酸相关代谢疾病的指导更有针对性。在临床实际操作中,组织标本的来源多靠活检,属于侵入性检查,创伤性太大,更是大大局限了组织叶酸检测的临床应用。对于科学研究来说,标本来源相对简单,组织叶酸研究更有意义,因此探讨组织叶酸检测方法对于研究叶酸对疾病或发育的影响更有意义。本研究比对了多种前处理参数对组织叶酸的影响,明确了化学发光法检测组织叶酸的可行可信性,对于研究组织叶酸具有实际指导意义。

参考文献(References)

- [1] Mentch S J, J W Locasale. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1363: 91-98
- [2] Ducker G S, J D Rabinowitz. One-Carbon Metabolism in Health and Disease[J]. *Cell Metab*, 2017, 25(1): 27-42
- [3] Blatch S A, S P Stabler, J F Harrison. The effects of folate intake on DNA and single-carbon pathway metabolism in the fruit fly *Drosophila melanogaster* compared to mammals [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2015, 189: 34-39
- [4] Champier J, F Claustrat, N Nazaret, et al. Folate depletion changes gene expression of fatty acid metabolism, DNA synthesis, and circadian cycle in male mice[J]. *Nutr Res*, 2012, 32(2): 124-132
- [5] Ebara S. Nutritional role of folate[J]. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2017, 57(5): 138-141
- [6] Obeid R, K Oexle, A Rissmann, et al. Folate status and health: challenges and opportunities[J]. *J Perinat Med*, 2016, 44(3): 261-268
- [7] McDonald S D, L Ferguson S Fau - Tam, J Tam L Fau - Lougheed, et al. The prevention of congenital anomalies with periconceptional folic acid supplementation [J]. *J Obstet Gynaecol Can*, 2013, 25 (2): 115-121
- [8] Desai A, J M Sequeira, E V Quadros. The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport[J]. *Biochimie*, 2016, 126: 31-42
- [9] Padmanabhan N, D Jia, C Geary-Joo, et al. Mutation in folate metabolism causes epigenetic instability and transgenerational effects on development[J]. *Cell*, 2013, 155(1): 81-93
- [10] Bestwick J P, W J Huttly, J K Morris, et al. Prevention of neural tube defects: a cross-sectional study of the uptake of folic acid supplementation in nearly half a million women [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89354
- [11] Irwin R E, K Pentieva, T Cassidy, et al. The interplay between DNA methylation, folate and neurocognitive development[J]. *Epigenomics*, 2016, 8(6): 863-879
- [12] Nazki F H, A S Sameer, B A Ganaie. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases [J]. *Gene*, 2014, 533(1): 11-20
- [13] Shane B, T Tamura, E L Stokstad. Folate assay: a comparison of radioassay and microbiological methods[J]. *Clin Chim Acta*, 1980, 100 (1): 13-19
- [14] Ikeda R, K Ichihama, N Tabuchi, et al. Determination of folates by HPLC-chemiluminescence using a ruthenium(II)-cerium(IV) system, and its application to pharmaceutical preparations and supplements [J]. *Luminescence*, 2014, 29(7): 824-830
- [15] Bailey L B, P J Stover, H McNulty, et al. Biomarkers of Nutrition for Development-Folate Review[J]. *J Nutr*, 2015, 145(7): 1636S-1680S
- [16] Molloy A M, J M Scott. Microbiological assay for serum, plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method [J]. *Methods Enzymol*, 1997, 281: 43-53
- [17] Wakeman L, S Al-Ismail, A Benton, et al. Robust, routine haematology reference ranges for healthy adults[J]. *Int J Lab Hematol*, 2007, 29(4): 279-283
- [18] Sharma S, J B Sharma, M Yadav, et al. Cross-sectional study of nutritional markers in pregnancy [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2016, 20 (6): 825-830
- [19] Reeves P G, F H Nielsen, G C 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
- [20] Denny K J, C F Kelly, V Kumar, et al. Autoantibodies against homocysteinylation protein in a mouse model of folate deficiency-induced neural tube defects [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2016, 106(3): 201-207

(下转第 1312 页)

- oocyte maturation in IVF treatment[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2018, 88(6): 920-927
- [9] Aghahosseini M, Aleyasin A, Chegini V, et al. Low-dose hCG as trigger day and 35 hr later have different ovarian hyperstimulation syndrome occurrence in females undergoing In vitro fertilization: An RCT[J]. Int J Reprod Biomed (Yazd), 2017, 15(11): 735-740
- [10] Thoreau A, Tran PL, Gabriele M, et al. Ureteral obstruction and ruptured kidney following ovarian hyperstimulation syndrome [J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2018, 47(4): 167-169
- [11] 刘伟信,曾琴,徐红.卵巢过度刺激综合征防治研究进展[J].中国计划生育和妇产科, 2017, 9(1): 20-23, 28
- [12] Asfour V, Varma R, Menon P. Clinical risk factors for ovarian torsion [J]. J Obstet Gynaecol, 2015, 35(7): 721-725
- [13] Dhanda S, Quek ST, Ting MY, et al. CT features in surgically proven cases of ovarian torsion-a pictorial review [J]. Br J Radiol, 2017, 90(1078): 20170052
- [14] Seyam E, Hefzy E. Laparoscopic ovarian drilling versus GnRH antagonist combined with cabergoline as a prophylaxis against the re-development of ovarian hyperstimulation syndrome[J]. Gynecol Endocrinol, 2018, 34(7): 616-622
- [15] Zech J, Brandao A, Zech M, et al. Elective frozen-thawed embryo transfer (FET) in women at risk for ovarian hyperstimulation syndrome[J]. Reprod Biol, 2018, 18(1): 46-52
- [16] Choux C, Barberet J, Ginod P, et al. Severe ovarian hyperstimulation syndrome modifies early maternal serum beta-human chorionic gonadotropin kinetics, but obstetrical and neonatal outcomes are not impacted[J]. Fertil Steril, 2017, 108(4): 650-658.e2
- [17] Artur Czekierdowski. Comment on: Case report of ovarian torsion mimicking ovarian cancer as an uncommon late complication of laparoscopic supracervical hysterectomy [J]. Prz Menopauzalny, 2017, 16(1): 26-28
- [18] Nizar K, Deutsch M, Filmer S, et al. Doppler studies of the ovarian venous blood flow in the diagnosis of adnexal torsion[J]. J Clin Ultrasound, 2009, 37(8): 436-439
- [19] 姚莉. 妊娠期附件行腹腔镜手术的可行性及对妊娠结局的影响分析[J].国际医药卫生导报, 2017, 23(12): 1902-1904
- [20] 程瑶,张晓玲.腹腔镜手术治疗妊娠期妇科疾病临床分析[J].江西医药, 2017, 52(9): 888-890, 910
- [21] Oelsner G, Cohen SB, Soriano D, et al. Minimal surgery for the twisted ischemic adnexa can preserve ovarian function [J]. Hum Reprod, 2003, 18(12): 2599-2602
- [22] 吴夏筠,黄宏伟.保留卵巢的卵巢肿瘤蒂扭转手术对患者凝血功能的影响[J].岭南急诊医学杂志, 2017, (4): 388-389
- [23] Bider D, Ben-Rafael Z, Goldenberg M, et al. Pregnancy outcome after unwinding of twisted ischaemic-haemorrhagic adnexa[J]. Br J Obstet Gynecol, 1989, 96(4): 428
- [24] 张碧云,王蓓,胡炳真.妊娠合并卵巢囊肿蒂扭转手术治疗 18 例临床分析[J].现代实用医学, 2011, 23(4): 451-452
- [25] 吴忱,胡君,朱丽荣.卵巢囊肿蒂扭转患者腹腔镜下保留卵巢手术 18 例临床分析[J].中国妇产科临床杂志, 2016, 17(4): 302-304
- [26] 张斌,郭艳,李静静.卵巢囊肿蒂扭转保留卵巢腹腔镜手术 62 例报告[J].中国微创外科杂志, 2014, 19(7): 600-602
- [27] 黄品,张明铭,邓曦和,等.腹腔镜下卵巢囊肿蒂扭转复位手术对卵巢储备功能影响[J].医学临床研究, 2018, 35(3): 435-437
- [28] 孙媛媛.妊娠合并卵巢囊肿蒂扭转的诊断和处理[J].中国微创外科杂志, 2017, 17(11): 1039-1041
- [29] 王萍. 卵巢囊肿蒂扭转手术中保留卵巢的治疗效果及安全性探究[J].实用妇科内分泌电子杂志, 2018, 4(12): 23, 26
- [30] 胡志芳,郑建军.保留患侧输卵管及卵巢的良性卵巢肿瘤蒂扭转复位及肿瘤剥除术临床分析 [J]. 医学临床研究, 2017, 34(10): 1930-1932

(上接第 1250 页)

- [21] Martiniova L, M S Field, J L Finkelstein, et al. Maternal dietary uridine causes, and deoxyuridine prevents, neural tube closure defects in a mouse model of folate-responsive neural tube defects[J]. Am J Clin Nutr, 2015, 101(4): 860-869
- [22] Lucock M, Z Yates, L Boyd, et al. Vitamin C-related nutrient-nutrient and nutrient-gene interactions that modify folate status[J]. Eur J Nutr, 2013, 52(2): 569-582
- [23] Huang Y, Y He, X Sun, et al. Maternal high folic acid supplement promotes glucose intolerance and insulin resistance in male mouse offspring fed a high-fat diet[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(4): 6298-6313
- [24] Duplessis M, H Lapierre, B Ouattara, et al. Whole-body propionate and glucose metabolism of multiparous dairy cows receiving folic acid and vitamin B12 supplements [J]. J Dairy Sci, 2017, 100(10): 8578-8589
- [25] Salari P, M Abdollahi, R Heshmat, et al. Effect of folic acid on bone metabolism: a randomized double blind clinical trial in postmenopausal osteoporotic women[J]. Daru, 2014, 22: 62
- [26] Crider K S, L B Bailey, R J Berry. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions [J]. Nutrients, 2011, 3(3): 370-384
- [27] 翁玉蓉,房静远,孙丹凤,等.叶酸受体 α 在胃癌组织中的表达及其与叶酸、亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性以及胃癌生物学行为的关系[J].胃肠病学, 2006, 11(4): 198-201
- [28] McGlynn A P, G R Wasson, S L O'Reilly, et al. Low colonocyte folate is associated with uracil misincorporation and global DNA hypomethylation in human colorectum[J]. J Nutr, 2013, 143(1): 27-33
- [29] 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
- [30] Wang L, S Chang, Z Wang, et al. Altered GNAS imprinting due to folic acid deficiency contributes to poor embryo development and may lead to neural tube defects [J]. Oncotarget, 2017, 8(67): 110797-110810
- [31] van Uitert E M, R P Steegers-Theunissen. Influence of maternal folate status on human fetal growth parameters [J]. Mol Nutr Food Res, 2013, 57(4): 582-595
- [32] Farrell C J, S H Kirsch, M Herrmann. Red cell or serum folate: what to do in clinical practice? [J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(3): 555-569
- [33] Marchetta C M, H C Hamner. Blood folate concentrations among women of childbearing age by race/ethnicity and acculturation, NHANES 2001-2010[J]. Matern Child Nutr, 2016, 12(1): 39-50
- [34] Crider K S, O Devine, L Hao, et al. Population red blood cell folate concentrations for prevention of neural tube defects: Bayesian model [J]. Bmj, 2014, 349: g4554