



# 叶酸介导的DNA甲基化与子代健康



武汉大学中南医院 张元珍  
发育源性疾病湖北省重点实验室  
[zhangyuanzhen@vip.sina.com](mailto:zhangyuanzhen@vip.sina.com)





## 提纲

- 一、叶酸来源与DNA甲基化
- 二、叶酸缺乏与子代疾病
- 三、叶酸补充与子代疾病





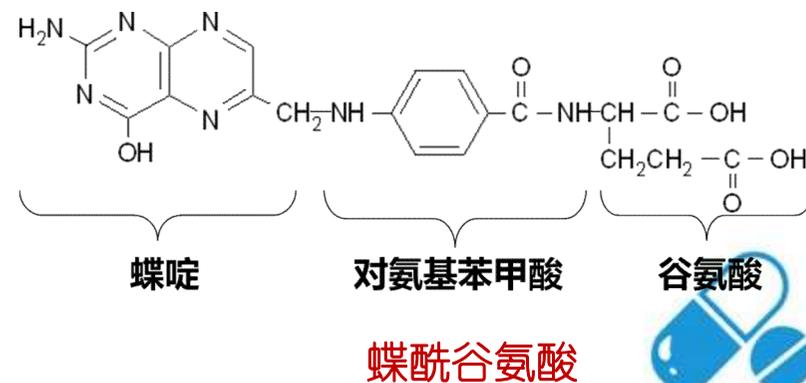
# 1. 叶酸-概述

## 叶酸 (folate, folic acid, folacin, FA)

- 1937年Lucy Wills在酵母和肝脏中发现了能改善孕妇巨幼细胞贫血的某种因子（后被证实为叶酸）
- 20世纪40年代首次分离于菠菜叶中而得名
- 化学名称为蝶酰谷氨酸 (pteroylglutamic acid, PGA)
- B族维生素之一，曾被称为维生素M、维生素BC、U因子、Wills因子、干酪乳杆菌生长因子



Lucy Wills





## 2. 叶酸的来源

### ● 食物叶酸 (folate)

- 天然形式
- 存在于天然食物中
- 性质不稳定
- 多谷氨酸盐
- 经过水解吸收
- 生物利用度50%



### ● 补充叶酸 (folic acid)

- 化学合成
- 存在于营养素增补剂和强化食品中
- 性质稳定
- 单谷氨酸盐
- 消化道直接吸收
- 生物利用度85%





## 叶酸-食物来源

叶酸广泛存在于各类动植物性食品中

- **含量丰富的食物**

- 动物肝、肾、蛋类、鱼类
- 豆类、酵母
- 绿叶蔬菜、水果及坚果类

- **需要注意**

- 叶酸与药物的交互作用
- 食物加工方式





## 中国常见富含叶酸的食物

食物类别	食物名称	叶酸 ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )
谷类及制品	藜麦粒 (青海)	247.2
	小麦粉 (黑, 中式)	135.7
干豆类及制品	黄豆(野生, 黑河) 【大豆】	403.1
	猫眼豇豆	399.1
蔬菜类及制品	黄花菜 【金针菜】	841.3
	红苋菜	419.8
菌藻类	肥鳞伞	180.0
	香菇 【干】	135.0
坚果、种子类	芝麻 (黑)	163.5
	花生米	107.5

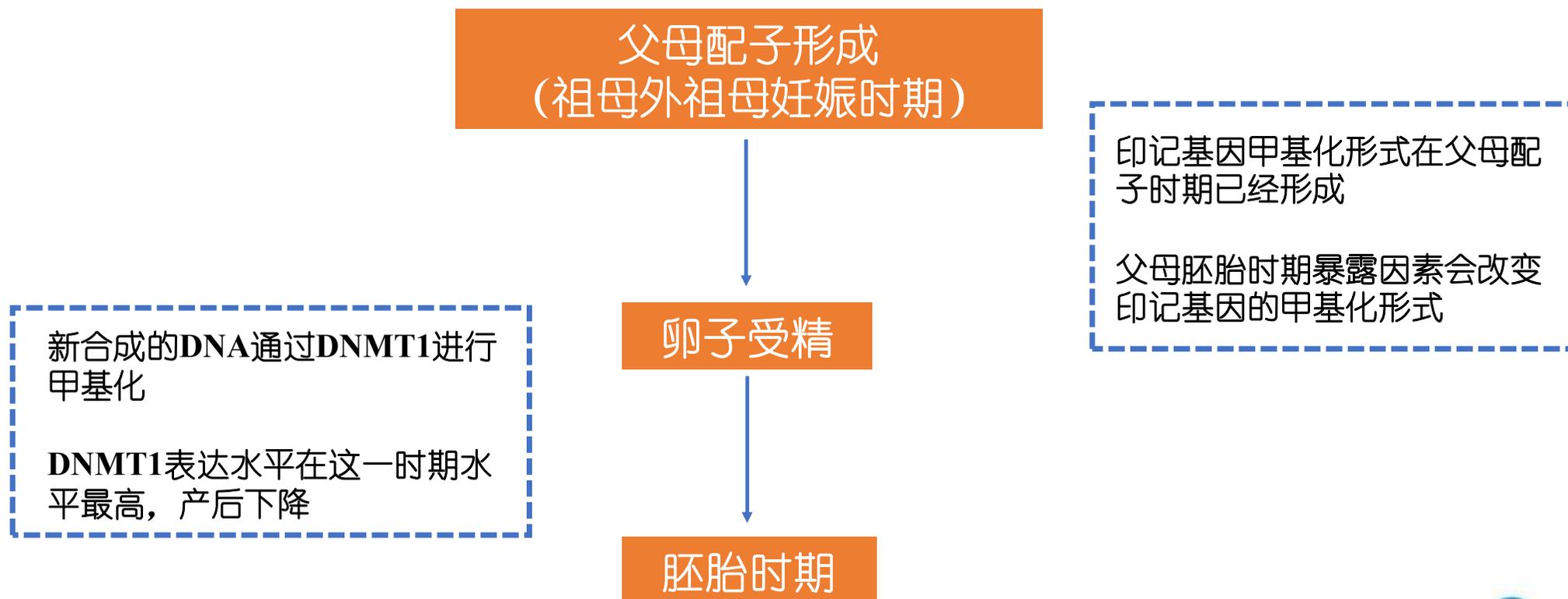
——《中国食物成分表标准版》(2017年)





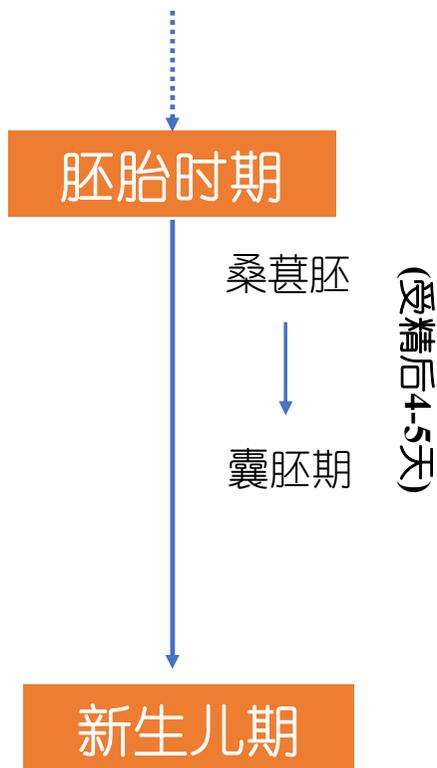


## 4. 胚胎发育时期DNA甲基化的改变



Crider KS, Adv Nutr. 2012; Lintas C, Clin Genet. 2018.





全基因组 (除外印记基因) 广泛的去甲基化;

多能干细胞随后通过DNMT3A和DNMT3B进行重新甲基化;

胚胎发育早期饮食环境暴露引起甲基化改变

DNMT3A和DNMT3B在成人的脑组织中少量表达 (调节突触的可塑性)

突触形成期间  
CpG甲基化急剧增加





## 提纲

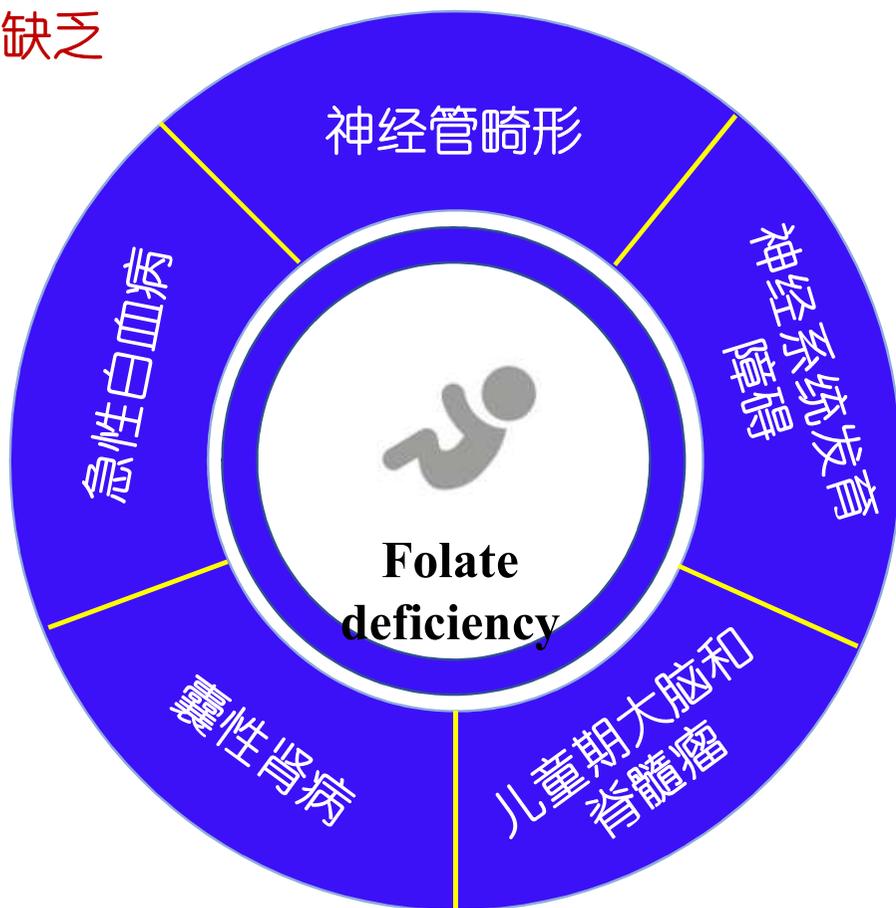
- 一、叶酸来源与DNA甲基化
- 二、叶酸缺乏与子代疾病
- 三、叶酸补充与子代疾病





## 叶酸缺乏与子代疾病

### 叶酸缺乏



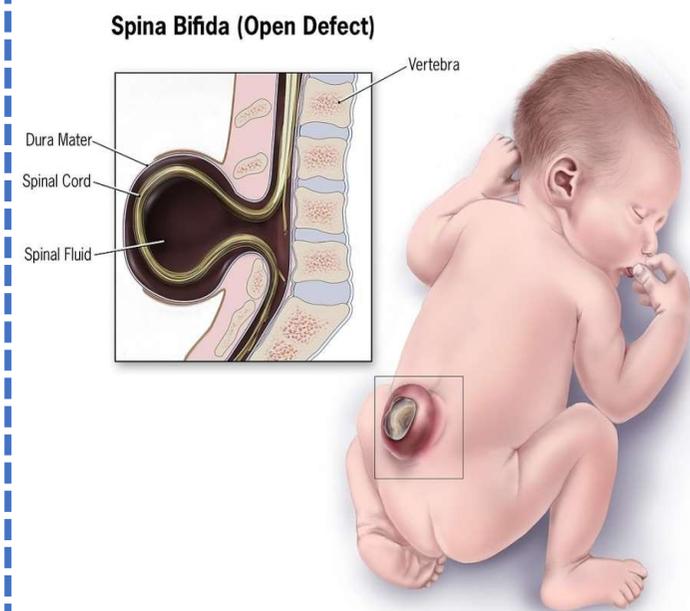
- 研究证明叶酸缺乏会增加很多疾病的发病风险
- 而围孕期叶酸补充能够降低发病风险
- 叶酸缺乏的原因
  - I. 叶酸摄入不足
  - II. 叶酸代谢转运差异
  - III. 叶酸代谢能力差异





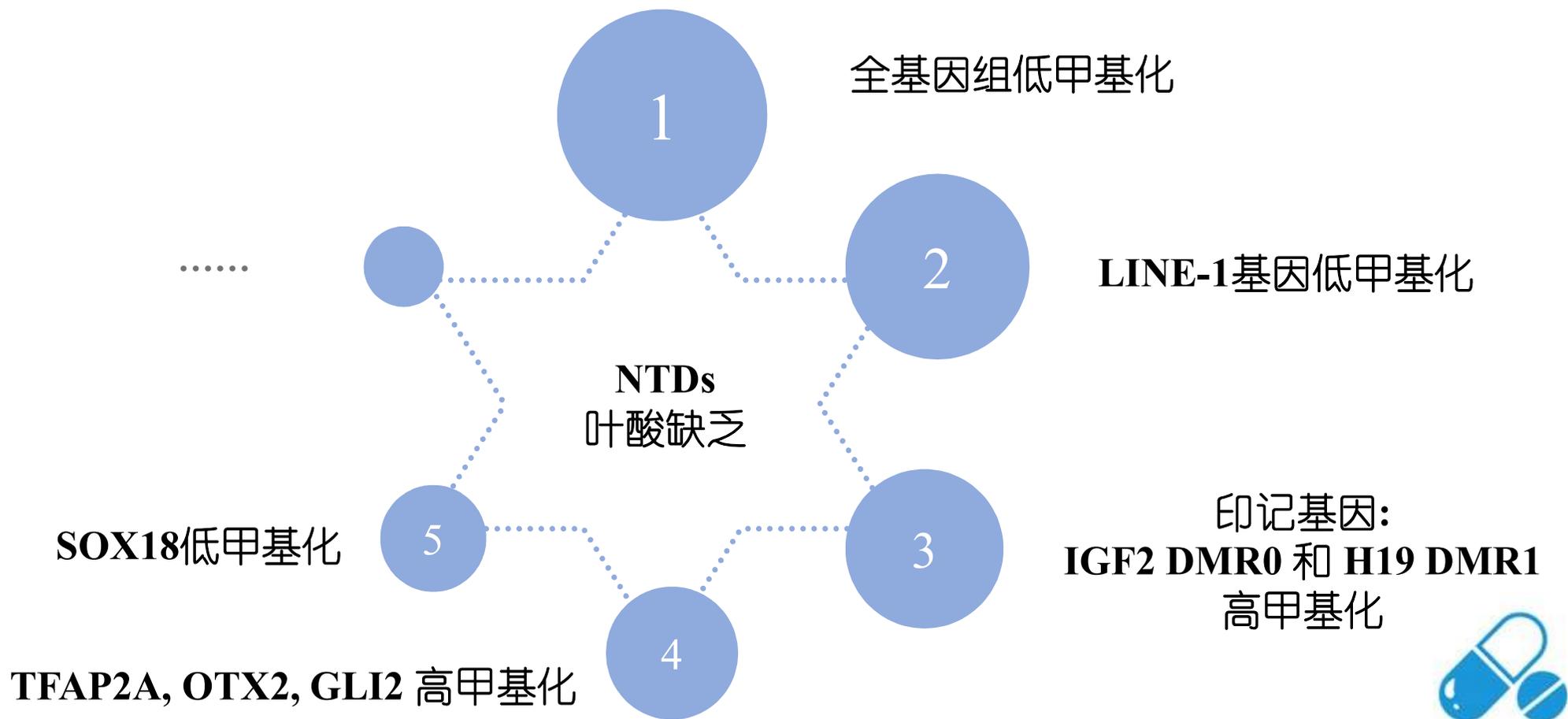
# 1. 神经管缺陷 (NTDs)

- 全球大约每年有30万活产婴儿患NTDs，由于地域差异发病率从 0.03/1000 至 20/1000 不等
- 1991年最终证实叶酸补充能够预防NTDs的发生
- 1998年美国 and 加拿大全面实行“强制叶酸补充”措施后，北美地区NTDs的患病率下降了35 – 50%
- 现在对NTDs发病机制的研究重要集中于寻找NTDs的致病基因及环境因素介导的表观遗传学改变





# 叶酸介导的DNA甲基化与NTDs





## 1-1 全基因组和LINE-1低甲基化

Risk of neural tube defect	Comparison of maternal vitamin B-12, folate, and total homocysteine (tHcy) between the neural tube defect (NTD) and control groups <sup>1</sup>			LINE-1 (LINE-1) <sup>1</sup>		
		NTD ( <i>n</i> = 32)	Control ( <i>n</i> = 36)	<i>P</i>	(95% CI) <sup>2</sup>	<i>P</i>
LINE-1 methylation ( <i>n</i> )						
≥P <sub>75</sub> [ <i>n</i> (%)]						—
P <sub>25</sub> –P <sub>75</sub> [ <i>n</i> (%)]					2.889)	0.650
≤P <sub>25</sub> [ <i>n</i> (%)]	Vitamin B-12 (pmol/L)	70.16 ± 19.03	88.62 ± 38.92	0.015	22.704)	0.009
Global methylation ( <i>n</i> )	Folate (nmol/L)	8.38 ± 3.23	10.57 ± 8.83	0.172		
≥P <sub>75</sub> [ <i>n</i> (%)]	tHcy (μmol/L)	15.21 ± 7.30 <sup>2</sup>	12.09 ± 7.33	0.068	3.078)	0.931
P <sub>25</sub> –P <sub>75</sub> [ <i>n</i> (%)]					9.872)	0.083
≤P <sub>25</sub> [ <i>n</i> (%)]						

<sup>1</sup> All values are means ± SDs. Student's *t* test was performed.

<sup>2</sup> *n* = 29.

大量研究发现在NTD患者的脑组织中全基因组和LINE-1的甲基化水平降低, 伴随母体血浆叶酸和Vit B12水平的降低,且低甲基化水平增加NTDs的发病风险





## 1-2 LINE-1低甲基化

- **LINE-1**一般情况下由于高甲基化而沉默，除外胚胎发育早期短暂低甲基化
- 叶酸缺乏时，细胞内低叶酸水平会导致**LINE-1**低甲基化，从而抑制胚胎干细胞向拟胚体的转化，由此导致**NTDs**的发生
- **Wang et al.** 推测**LINE-1**启动子区域的低甲基化使得**LINE-1**表达增高，进而导致早期胚胎发育时基因结构的破坏和染色体稳定性的改变

Rochtus A, Mini Rev Med Chem 2015; Wang L, Curr Mol Med 2015



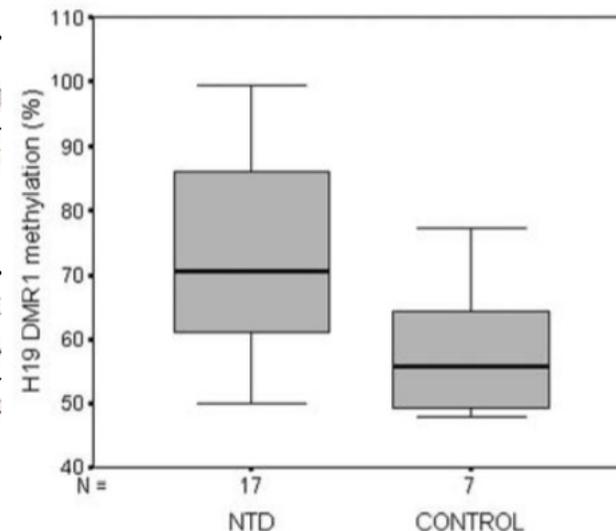


## 1-3 印记基因:IGF2 DMR0 和 H19 DMR1 高甲基化

Table 1 Average methylation of *IGF2* DMR0 and 2 in control fetuses, fetuses with an NTD, spina

	Control		Spina bifida		<i>p</i> value	Encephalocele		<i>p</i> v
	<i>n</i>	Methylation level (%)	<i>n</i>	Methylation level (%)		<i>n</i>	Methylation level (%)	
DMR0	46	16.7 ± 3.3	38	19.2 ± 3.8	0.002	17	19.4 ± 6.2	0.0
DMR2	46	40.6 ± 2.7	36	41.2 ± 2.7	0.410	17	40.9 ± 6.2	0.2

Student's *t* test was used to assess the statistical significance among NTD, spina bifida and control groups. The difference between encephalocele and control groups. All the values are in mean ± SD



**IGF2 DMR0和H19 DMR1在NTDs患者中甲基化水平升高，且高甲基化水平与NTDs发生有关，并且研究发现IGF DMR0的表达与HCT 15细胞中IGF DMR0的甲基化水平呈负相关。**

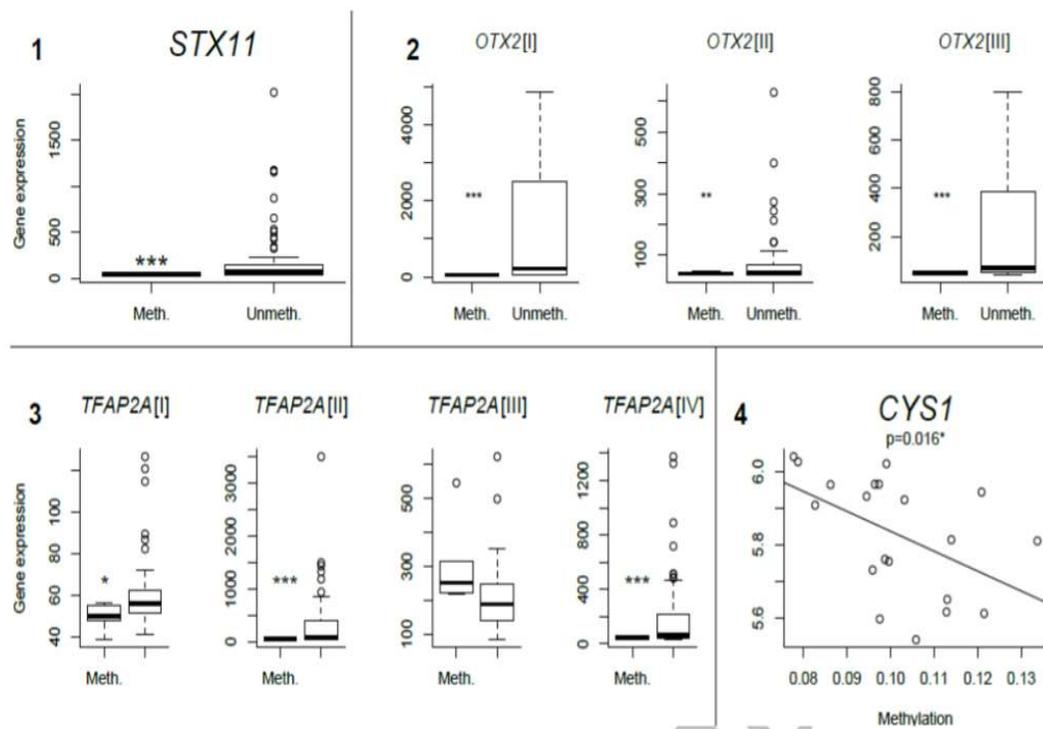




# 1-4 TFAP2A, OTX2, GLI2 高甲基化

## TFAP2A, OTX2高甲基化

- TFAP2A和OTX2对正常的神经发育调控十分重要，并且编码与表皮和神经脊发育相关的转录因子
- 怀孕时低叶酸水平与TFAP2A和OTX2的甲基化水平相关
- TFAP2A和OTX2高甲基化抑制其RNA的表达



Knight RD, Development 2003; Gonseth S, Epigenetics 2015.

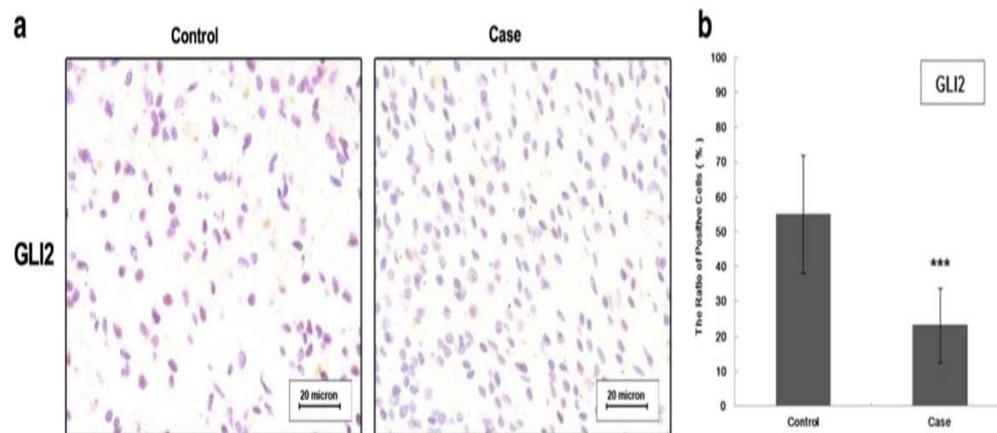


# 1-4 TFAP2A, OTX2, GLI2 高甲基化

## GLI2高甲基化

- GLI2是sonic hedgehog (Shh)信号通路中的重要基因，在脊椎类动物胚胎发育时与神经管缺陷发生相关
- GLI2在NTDs患者中甲基化水平增高，伴随GLI2表达下降
- 脑组织中叶酸水平与GLI2甲基化呈负相关，GLI2高甲基化增加NTDs的发病风险

**Table 2** Risk of spina bifida associated with methylation level of the



**Fig. 2** Immunostaining of GLI2 in brain tissue of samples isolated from patients with spina bifida or controls. **a.** Blue color indicated cells, with negative staining; brown color indicated the immunoreactivity. **b.** The ratio of GLI2-positive cells in spina bifida samples was significantly lower than that in controls. Results were shown as mean±SD. \*\*\* $P < 0.001$

≤P25[n(%)]	13(25.0)	3(4.3)	1	-
P25~P75[n(%)]	28(53.8)	27(38.6)	3.77(0.93–15.29)	0.063
≥P75[n(%)]	11(21.2)	40(57.1)	12.45(2.71–57.22)	0.001

OR odds ratio

<sup>a</sup> Cutoffs defined as 25th and 75th percentiles of the control group methylation level

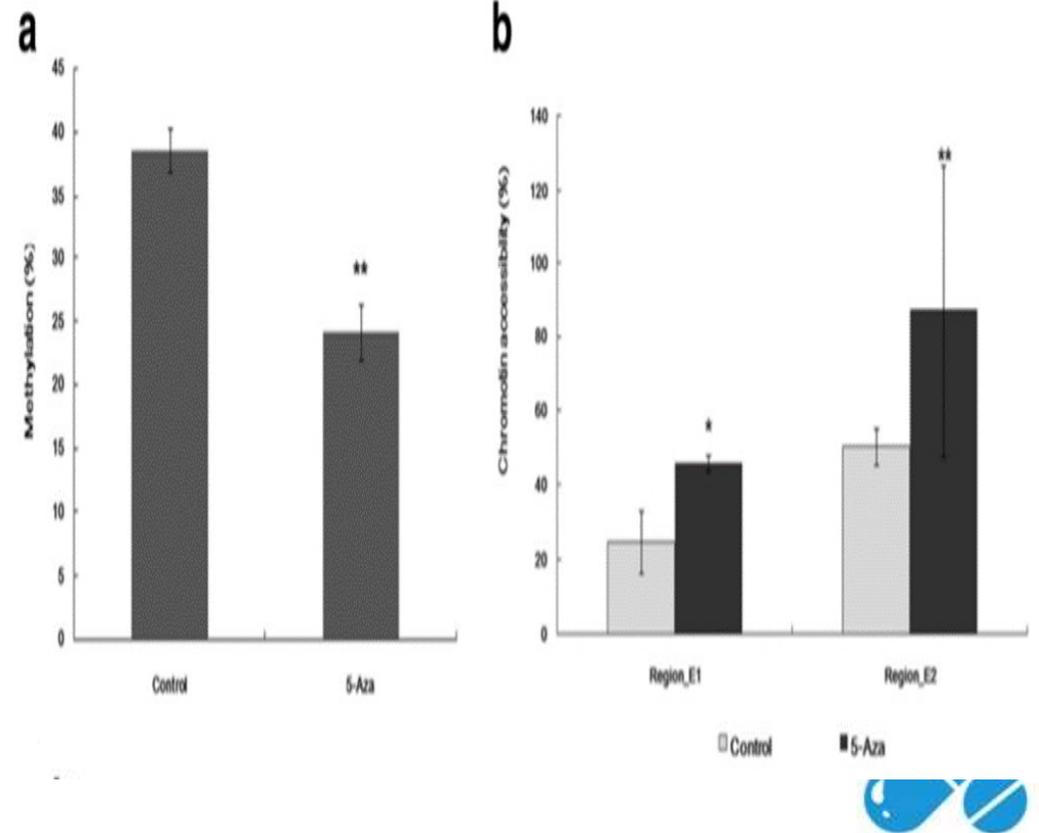
<sup>b</sup> Adjusted by gestation week and sex by logistic regression



# 1-4 TFAP2A, OTX2, GLI2 高甲基化

## GLI2高甲基化

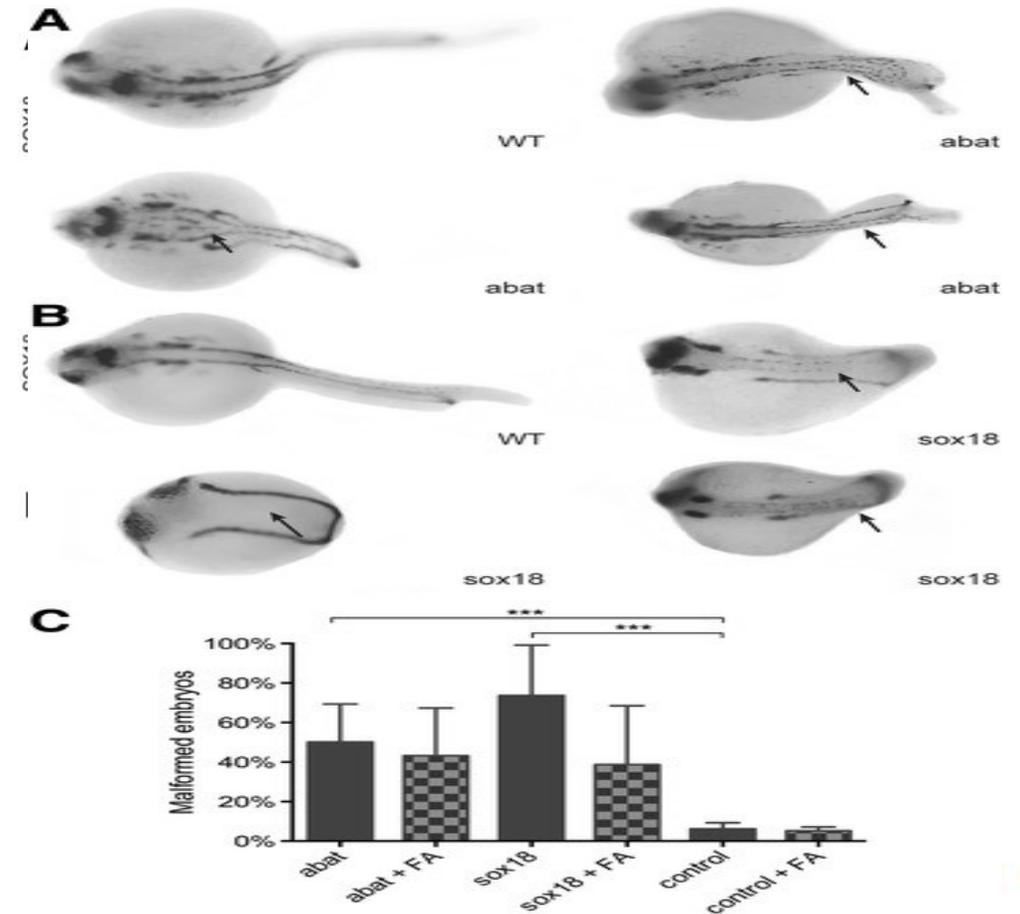
- 构建细胞模型，去甲基化药物（5-aza-2-deoxycytidine）处理后，GLI2mRNA表达水平增高，GLI2高甲基化导致染色质异常及包含转录因子的核受体表达下降
- GLI2高甲基化影响染色体稳定性和转录因子结合能力，导致NTD患者GLI2表达水平降低





## 1-5 SOX18低甲基化

- 脊髓脊膜突出 (MMC) 患者白细胞中SOX18显著低甲基化
- 化学诱导HEK细胞DNA去甲基化导致SOX18甲基化水平降低和表达增高
- 向斑马鱼胚胎中注入SOX18mRNA引起异常神经管发生





## 2. 神经系统发育障碍

- 神经系统发育障碍是一组遗传性精神疾病，包括自闭症（ASD）、智力障碍、沟通障碍、注意力缺陷多动症（AHDH）等
- 一系列研究证实孕期叶酸补充对认知与运动功能发育十分重要
- 也有研究指出叶酸缺乏不仅能够影响神经管关闭并且在后续的神经发育调节中起重要作用



Veena SR, J Nutr 2010; Anjos T, Eur J Nutr 2013





## 2. 神经系统发育障碍

- meta分析显示孕期叶酸补充能够显著降低ASD的发生风险，并且与种族无关
- 另一研究发现，孕期补充复合维生素的频率与ASD发生呈“U”型相关

即孕早期补充频率为 3-5次/周，显著降低ASD发病风险；  
补充频率  $\leq 2$ 次/周 或  $> 5$ 次/周 ASD发病风险反而增高

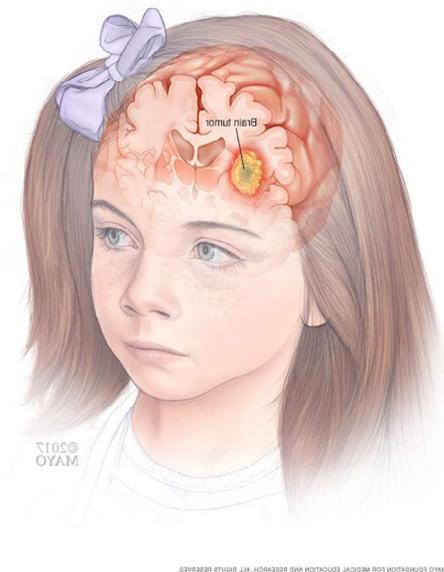
AUTISM





### 3. 儿童期大脑和脊髓瘤(CBSCT)

- 儿童期大脑和脊髓瘤是儿童时期第二常见的肿瘤
- 美国2010-2014年的CBSCT的发病率为4.75/100000 儿童 (95% IC 4.67–4.83)
- 美国实施“强制添加叶酸”计划之后，从1993年至2008年原发性神经外胚层肿瘤发生率显著降低



Ostrom QT, Neuro Oncol 2017; Linabery AM, Pediatrics. 2012





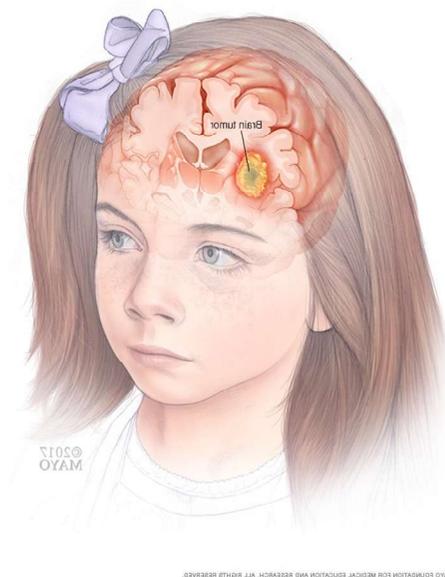
### 3. 儿童期大脑和脊髓瘤(CBSCT)

- 一系列研究发现孕期叶酸补充能够降低CBSCT的发病风险
- meta分析显示围孕期服用叶酸能够显著降低CBSCT的发病风险；孕前补充叶酸或孕期补充叶酸均能有效降低发病风险



(效用)

- 还有研究指出母亲孕期（包括孕中、晚期）饮食中添加叶酸对CBSCT起保护作用，尤其在孕妇摄入酒精的情况下

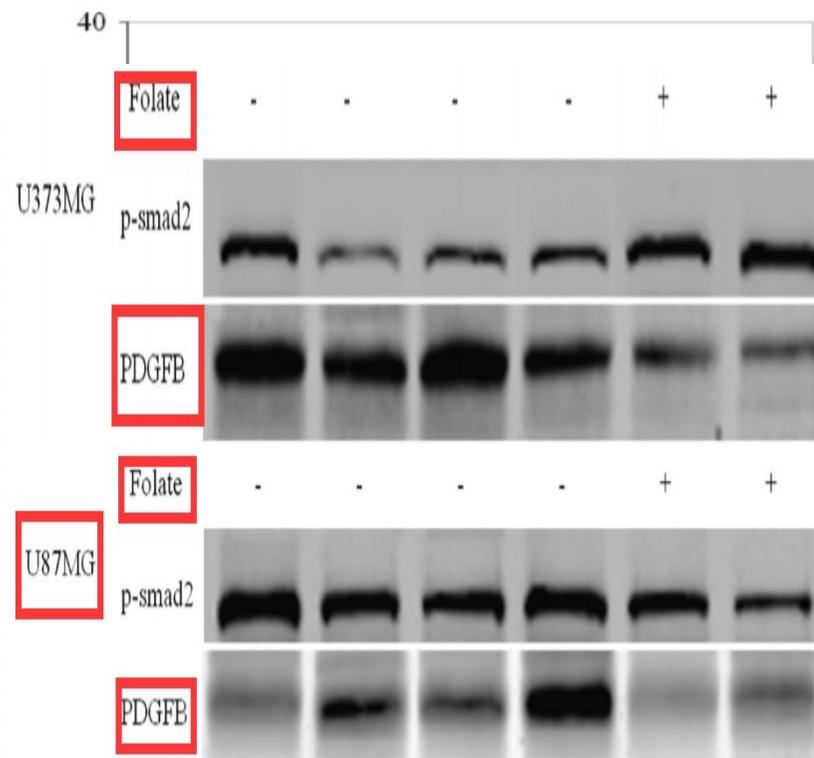




### 3. 儿童期大脑和脊髓瘤(CBSCT)

#### PDGF-B

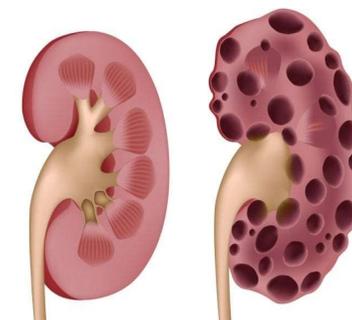
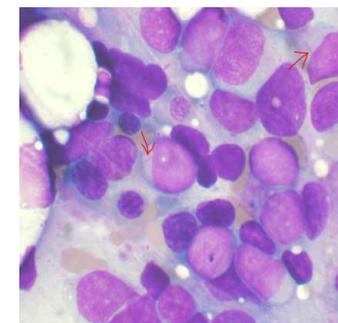
- PDGF-B是调节细胞移行、增殖分化的生长因子
- 研究发现PDGF-B启动子低甲基化导致PDGF-B高表达，从而影响胶质瘤细胞的增殖
- 用叶酸处理U373MG 和 U87MG细胞致使PDGF-B基因启动子高甲基化、表达水平下降，并且细胞增殖能力显著降低。





## 4. 急性白血病/囊性肾病

- 研究支持孕期叶酸补充可能降低儿童急性白血病的风险
- *STX11*基因CpG甲基化改变与儿童期急性髓系白血病有关
- *CYS1*基因CpG甲基化改变与囊性肾病有关



Amigou A, Cancer Causes Control 2012; Metayer C, Cancer Causes Control 2011; Gonseth S, Epigenetics 2015





## 提纲

- 一、叶酸来源与DNA甲基化
- 二、叶酸缺乏与子代疾病
- 三、叶酸补充与子代疾病





# 1. 叶酸补充史

1965

首次发现叶酸缺乏可能引起NTDs

	0.4mg 叶酸	0.8mg 叶酸	4mg 叶酸
无高危因素的妇女	√	√	-
患先天性脑积水、先天性心脏病、唇腭裂、肢体缺陷、泌尿系统缺陷，或有上述缺陷家族史，或一、二级直系亲属中有神经管缺陷生育史的妇女	-	√	-
患糖尿病、肥胖或癫痫的妇女	-	√	-
患胃肠道吸收不良性疾病的妇女	-	√	-
正在服用增加胎儿神经管缺陷风险药物的妇女	-	√	-
夫妻一方患神经管缺陷或有神经管缺陷生育史的妇女	-	-	√

2017

《妊娠期增补叶酸预防神经管缺陷指南（2017）》





## 2. “强制添加叶酸”史

### “强制添加叶酸”



1996

美国首次提出在小麦面粉中“强制添加叶酸”

1998

在全美范围内实施；加拿大也开始实施

2012

美国FDA批准在玉米面粉中强制添加叶酸以降低西班牙裔NTDs患病率

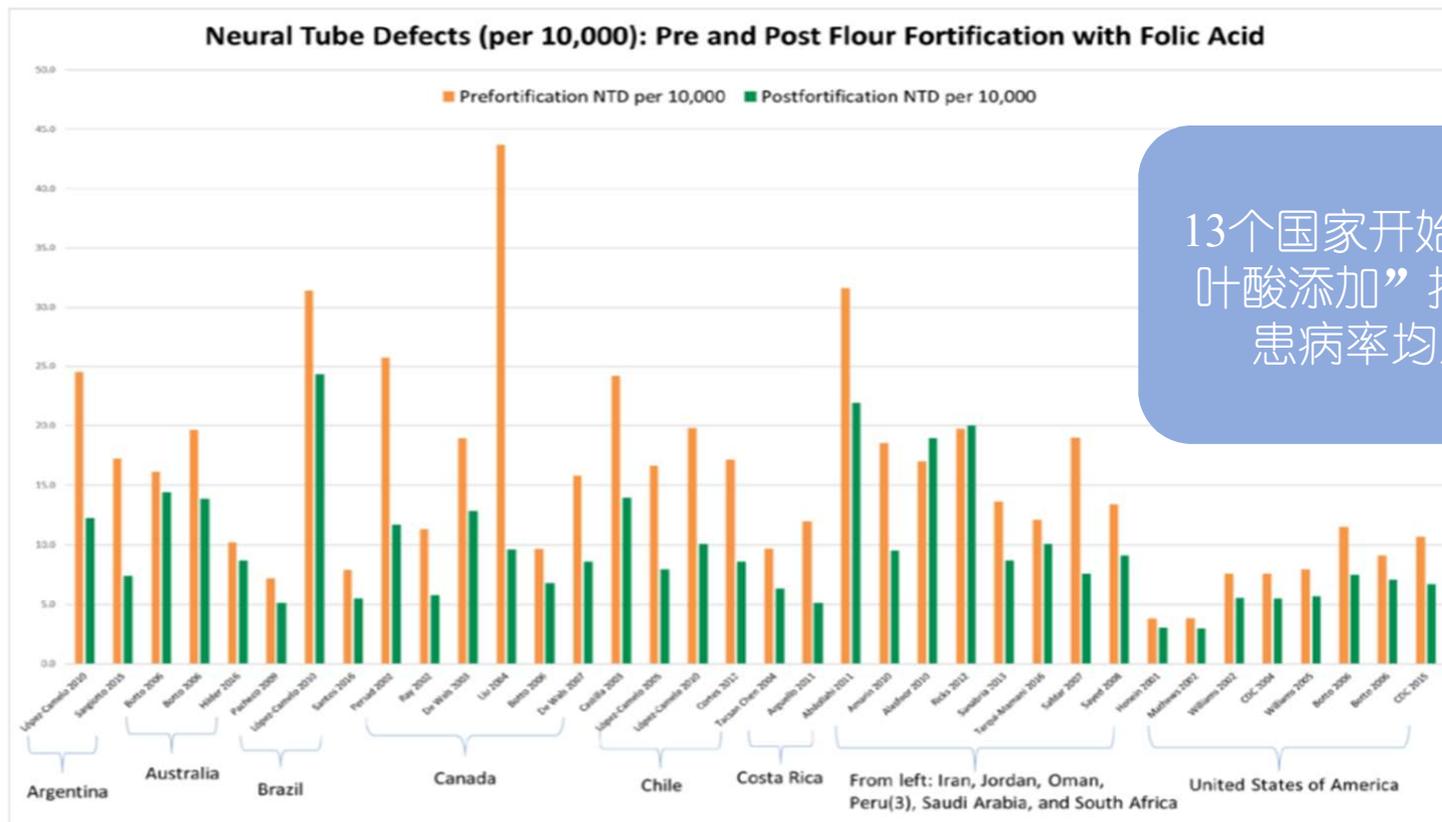
2018

截止2018年6月，已经有86个国家在主食中“强制添加叶酸”





**Figure. A review of 36 documents that reported the prevalence of NTDs per 10,000 births\* before and after the initiation of flour fortification with folic acid in 13 countries.**



13个国家开始实行“强制叶酸添加”措施后NTDs患病率均显著下降

\* The denominator can include live births, still births or terminations.

Food Fortification Initiative (FFI). Fortifying Flour with Folic Acid to Prevent Neural Tube Defects. Atlanta, USA: FFI, 2017. Available from [www.FFINetwork.org](http://www.FFINetwork.org)





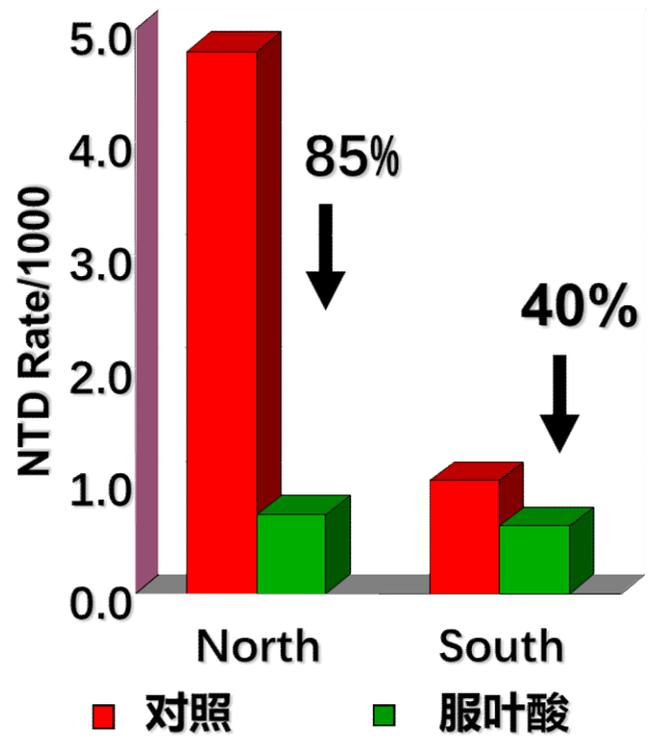
### 3. 增补叶酸预防神经管缺陷

- 妊娠前后增补叶酸预防神经管畸形（中美合作项目）

**1991-1993 预实验**  
**1993-1998 正式研究阶段**

**干预措施：**  
**每日增补叶酸 400 微克**  
**247,831 出生**

- 神经管畸形率降低 85%
- 其他重大出生缺陷率降低 15%
- 婴儿死亡率降低 20%



Berry RJ, Li Z et al. NEJM 1999;342:1485

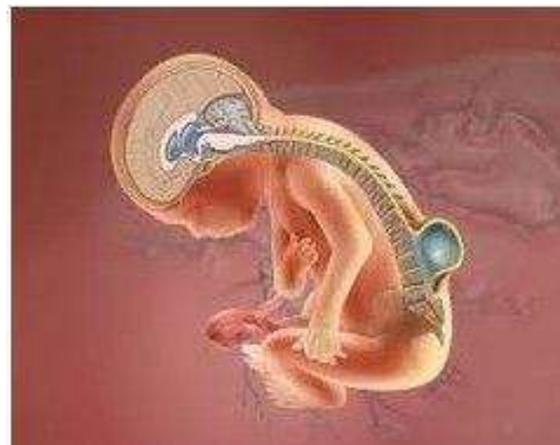




顺位	1996年	2000年	2005年	2010年	2011年
1	总唇裂 (14.50)	总唇裂 (14.07)	先天性心脏病 (23.96)	先天性心脏病 (28.82)	先天性心脏病 (40.95)
2	神经管缺陷 (13.60)	多指(趾) (12.45)	多指(趾) (14.66)	多指(趾) (15.91)	多指(趾) (16.73)
3	多指(趾) (9.20)	神经管缺陷 (11.96)	总唇裂 (13.73)	总唇裂 (13.17)	总唇裂 (11.43)
4	脑积水 (6.50)	先天性心脏病 (11.40)	神经管缺陷 (8.84)	神经管缺陷 (6.48)	脑积水 (5.47)
5	先天性心脏病 (6.20)	脑积水 (7.10)	脑积水 (7.52)	脑积水 (6.00)	马蹄内翻 (5.17)
6	肢体短缩 (5.21)	肢体短缩 (5.79)	肢体短缩 (5.76)	马蹄内翻 (5.08)	尿道下裂 (5.03)
7	马蹄内翻 (4.69)	马蹄内翻 (4.97)	尿道下裂 (5.24)	尿道下裂 (4.87)	并指(趾) (4.88)
8	尿道下裂 (3.08)	尿道下裂 (4.07)	马蹄内翻 (5.06)	并指(趾) (4.81)	神经管缺陷 (4.50)
9	并指(趾) (3.08)	并指(趾) (3.95)	并指(趾) (4.94)	肢体短缩 (4.74)	肢体短缩 (4.09)
10	小耳 (2.86)	直肠肛门闭 锁或狭窄 (3.43)	小耳 (3.60)	小耳 (3.09)	小耳 (2.79)

源自中国出生缺陷防治报告 (2012)

胎儿神经管畸形 (NTD)  
主要表现为无脑儿、脑  
膨出、脑脊髓膜膨出、  
脊柱裂/隐性脊柱裂、唇  
裂及腭裂等

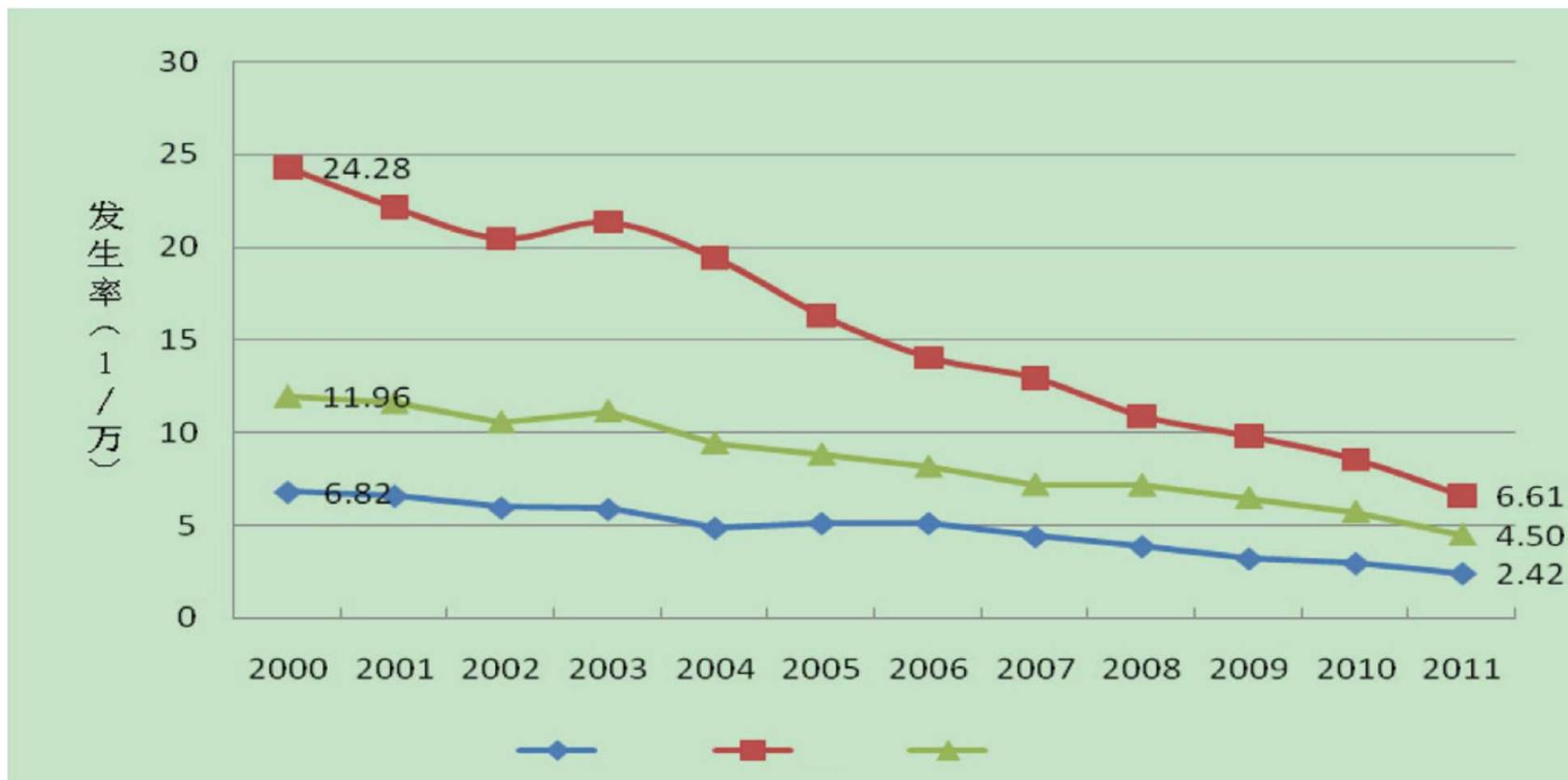


出生缺陷干预：财政投入3.2亿元  
1996年 13.6/万 → 2011年 4.5/万





## 2000-2011年全国围产儿神经管缺陷的发生率趋势



源自中国出生缺陷防治报告 (2012)





## 4. 叶酸补充与子代疾病

- 2016年，美国公共卫生署建议至少从妊娠前一个月到妊娠第2-3个月补充叶酸。
- 由于在主食中强制添加叶酸，很多孕妇在妊娠3个月后仍然继续补充叶酸。
- 研究发现仅有55-60%的孕妇在孕早期补充叶酸，76-78%在孕中期补充，而89%的孕妇在孕晚期补充叶酸。

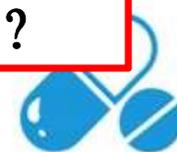
**TABLE 4** Percent of pregnant women taking a folic acid or iron-containing supplement by trimester of pregnancy in NHANES 1999–2006<sup>1</sup>

Trimester	Unweighted <i>n</i>	Iron	Folic acid
			%
First	238	56.1 ± 6.7	60.0 ± 7.0
Second	458	76.4 ± 3.8	78.8 ± 3.5
Third	420	89.9 ± 2.3	89.2 ± 2.5
Missing <sup>2</sup>	180	56.4 ± 6.4	56.5 ± 6.4

<sup>1</sup> Values are percentage ± SE based on weighted data.

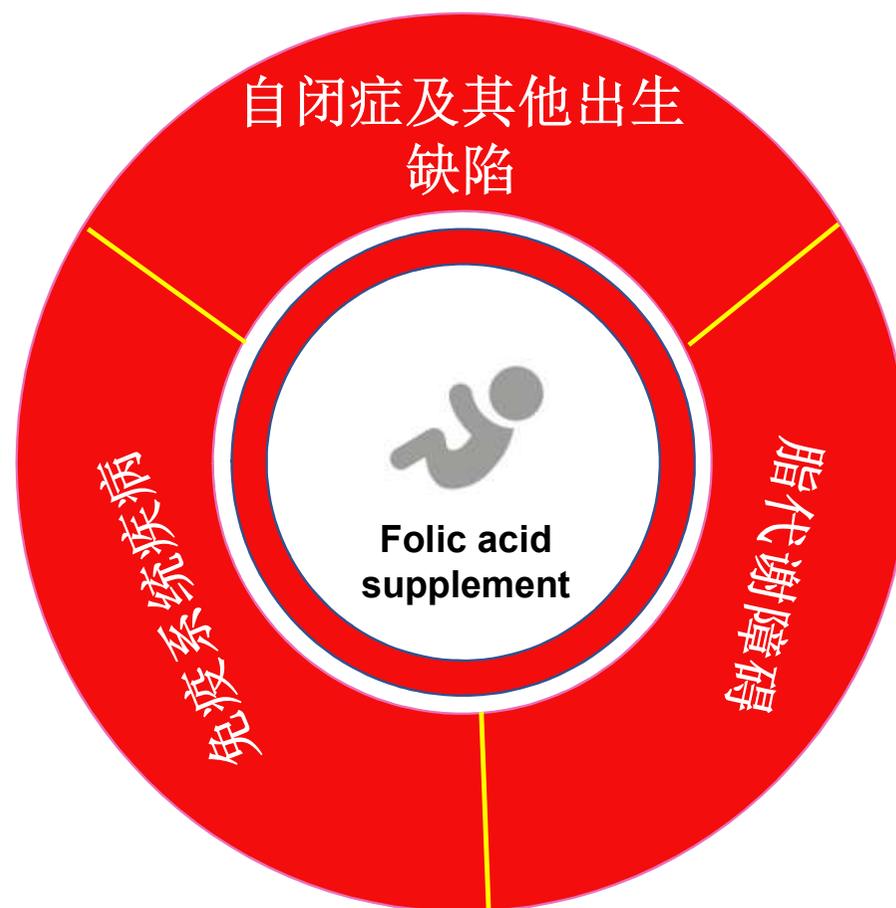
<sup>2</sup> Missing denotes women who were missing information on month of pregnancy.

因此科学家们开始关注在孕中晚期继续补充叶酸对子代健康有益还是有害？





- 孕中晚期持续补充叶酸会导致全基因组，**LINE-1** 和**PEG3**的甲基化水平降低；**IGF2**甲基化水平升高
- 持续补充叶酸，脐带血组织中 **LINE-1**、**BDNF**、**IGF2** 基因显著低甲基化



Joubert BR, Nat Commun. 2016; Caffrey A, Am J Clin Nutr 2018

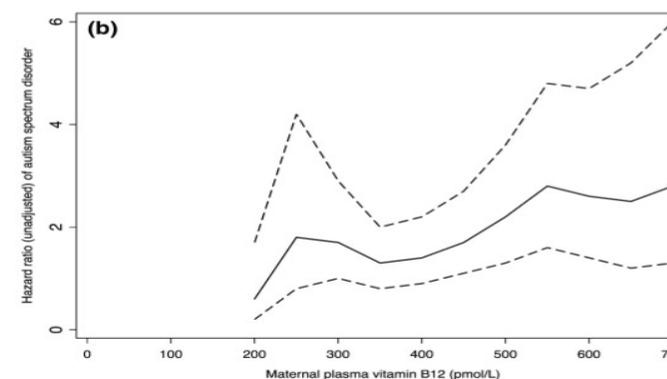
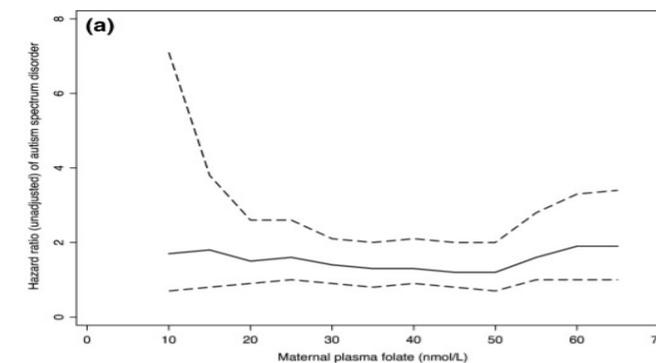




## 4-1 自闭症及其他出生缺陷

### 自闭症(ASD)

- 叶酸补充可以降低神经系统发育障碍（包括ASD）的风险
- 一项前瞻性研究发现，分娩时母体血浆极高的叶酸和VitB12水平增加ASD的发病风险
- 孕期补充复合维生素的频率与ASD发生呈“U”型相关  
即孕早期补充频率为3-5次/周，显著降低ASD发病风险；  
补充频率 $\leq 2$ 次/周或 $> 5$ 次/周ASD发病风险反而增高





## 其他出生缺陷

- 全基因组甲基化分析发现与母体叶酸水平与某些基因 (APC2, GRM8, SLC16A12, KLK4, LHX1) 甲基化改变相关
- 这些基因在早期胚胎发育中起重要作用，突变可能引起出生缺陷

基因	相关出生缺陷
APC2	影响神经发育及致癌作用
GRM8	编码谷氨酸受体（在神经递质传递中发挥重要作用） GRM8拷贝数的变异与注意力缺陷多动症相关
SLC16A12	与伴随小角膜和肾性糖尿病的青少年白内障相关
KLK4	与牙釉质发育不全相关
LHX1	与子宫发育异常相关





## 4-2 免疫系统疾病

一系列研究探究叶酸补充与子代过敏性疾病的关系

相关研究	叶酸补充	免疫性疾病	人群
2009, HA° BERG et al.	孕早期叶酸	哮喘	18个月以内大的婴儿
2009, WHITROW et al.	孕晚期 (30-34 周)	哮喘; 持续性哮喘	3.5岁; 3.5-5.5岁
2012, Bekkers et al.	孕期	哮喘 呼吸道感染	1岁 1-8岁
2012, Kiefte-de Jong et al	孕前和孕早期	特异性皮炎	4岁以内
2012, Dunstan et al.	孕晚期	湿疹	1岁
2011, Haberg et al.	孕中期 (18周)	哮喘	3岁





## 表观遗传学改变

- 血液中DNA 甲基化标志及 CD4+ T 细胞中的异常甲基化可能提示胎儿食物过敏临床反应
- IgE介导的牛奶过敏患者IL-4 和 IL-5 DNA甲基化水平降低， IL-10 and INF- $\gamma$  DNA甲基化水平升高

非常有必要研究孕中晚期叶酸暴露介导的DNA甲基化与免疫系统疾病的相关性

Martino D, J Allergy Clin Immunol 2015; Martino D, Epigenetics 2014; Berni Canani R, Clin Epigenetics 2015





## 4-3 脂代谢异常

- 母体血浆高叶酸水平可能增加胰岛素抵抗的风险，增加子代体重，导致葡萄糖对胰岛素反应受损
- 研究发现叶酸补充导致的ATGL和LPL启动子/第一个外显子区域的DNA甲基化改变，导致ATGL和LPL的表达水平下降，从而加重子代高脂肪饮食的子代脂代谢更加紊乱

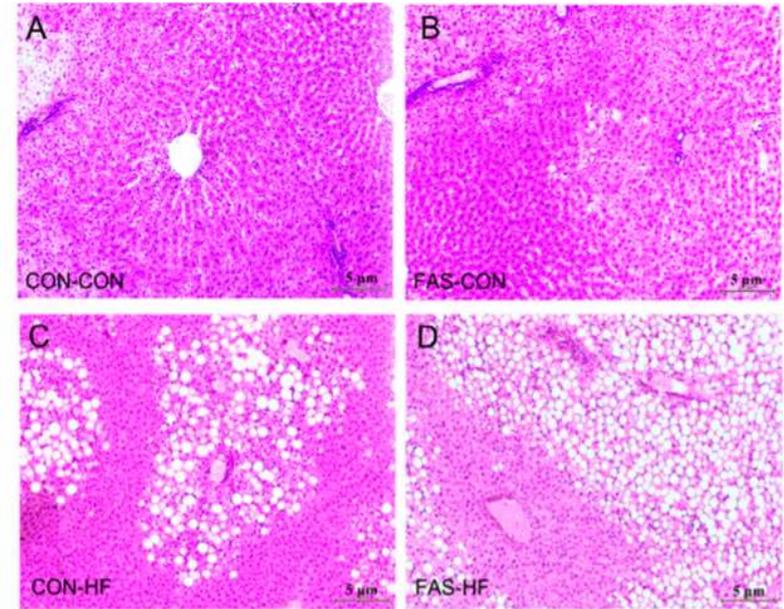


Figure 3. H&E stains of representative liver sections of male: CON-CON (A); FAS-CON (B); CON-HF (C); and FAS-HF (D) offspring at 15 weeks (40 $\times$ ).





## 总结

- 孕前及早孕期适量叶酸补充能够降低NTDs及某些疾病的发病风险，证据明确，不容忽视
- 孕中、晚期叶酸补充，过高剂量的叶酸补充有可能与自闭症、免疫系统疾病等疾病的发生相关
- 应该着眼于叶酸与疾病保护与致病作用的机制研究
- 关注叶酸代谢能力、叶酸最适补充剂量、补充时长等，找到叶酸补充对于子代健康最适的平衡点





*Thank You*

