

# 母体糖尿病诱导胚胎神经管畸形的分子机制 和治疗研究进展

蔡淑芳 周美 王冰斌 郑国伟 张亦维 钟浩东 吴艳青\*

(温州大学, 生命与环境科学学院-生命科学研究院, 温州 325035)

**摘要** 胚胎神经管畸形(NTDs)是一种严重的先天性畸形,它是神经管在胚胎发育阶段无法正常闭合或闭合不完全导致的缺陷。母体糖尿病显著增加胚胎NTDs的发生概率。母体糖尿病可诱导胚胎内的氧化应激、内质网应激、细胞自噬功能受损、异常的细胞凋亡和细胞早衰等分子机制,导致胚胎神经管闭合异常。该文将综述当前母体糖尿病诱发胚胎NTDs发生机理和治疗策略,探究相关研究进展,为临床上预防和治疗母体糖尿病诱导的胚胎NTDs提供理论基础。

**关键词** 神经管畸形; 糖尿病; 细胞凋亡; 细胞自噬; 细胞衰老

## Advances in the Molecular Mechanism and Treatment of Maternal Diabetes-Induced Embryonic Neural Tube Defects

CAI Shufang, ZHOU Mei, WANG Bingbin, ZHENG Guowei, ZHANG Yiwei, ZHONG Haodong, WU Yanqing\*

(The Institute of Life Sciences, College of Life and Environmental Sciences, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China)

**Abstract** NTDs (neural tube defects) is one kind of serious congenital malformation, which is caused by the inability or incomplete closure of neural tube during embryonic development. Maternal diabetes significantly increases the incidence of NTDs in embryos. Maternal diabetes can induce the molecular mechanisms of oxidative stress, ERS (endoplasmic reticulum stress), impaired autophagy, excessive apoptosis and cell senescence in embryos, and ultimately lead to abnormal neural tube closure in embryos. Current paper will describe the research progress on the mechanism and treatment strategies of maternal diabetes-induced embryonic NTDs, and provide a theoretical basis for the clinically prevention and treatment of maternal diabetes-induced embryonic NTDs.

**Keywords** neural tube defects; diabetic mellitus; cell apoptosis; cell autophagy; cell senescence

胚胎发育期间由于神经管闭合不全导致的先天性畸形被称为神经管畸形(neural tube defects, NTDs),包括无脑畸形、脊柱裂和脑膨出等类型,是继先天性心脏病后的第二大类出生缺陷<sup>[1]</sup>。NTDs发病率在不同地区有所不同,在全球范围内的发生率为0.055%~2.100%,预计全世界每年新增30万NTDs

患者<sup>[2]</sup>。经研究,NTDs的致病因素包括遗传因素和环境因素<sup>[3]</sup>。目前,孕期叶酸的补充是有效预防NTDs的主要方法,但其预防效率仅为30%~50%<sup>[4]</sup>。全球每年仍有30万~50万NTDs患儿出生,其中有8.8万NTDs患儿在出生后死亡<sup>[5]</sup>。目前有研究证实,母体糖尿病(diabetic mellitus, DM)会显著增加胚胎

收稿日期: 2022-04-28 接受日期: 2022-07-05

浙江省自然科学基金(批准号: LY22H090007)、温州市基础性科研项目(批准号: Y20220060)和温州大学研究生科研创新基金(批准号: 316202101044)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0577-86591683, E-mail: yqwu220946@yeah.net

Received: April 28, 2022 Accepted: July 5, 2022

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No. LY22H090007), the Basic Scientific Research Project of Wenzhou (Grant No. Y20220060) and the Graduate Scientific Research Foundation of Wenzhou University (Grant No. 316202101044)

\*Corresponding author. Tel: +86-577-86591683, E-mail: yqwu220946@yeah.net

NTDs的发生率。为此,亟需进一步探究母体糖尿病诱导胚胎NTDs发生的调控机制和治疗靶点,这将有利于寻找并开发母体糖尿病介导的胚胎NTDs的新型治疗药物。本文将系统综述母体糖尿病对胚胎NTDs的分子调控机制及其治疗策略相关前沿研究,为临床上预防和治疗母体糖尿病介导的胚胎NTDs提供理论基础。

## 1 母体糖尿病对胚胎神经管发育的影响

DM是一种由于胰岛素分泌缺陷或胰岛素作用障碍所致的代谢异常性疾病,分为一型糖尿病和二型糖尿病。高血糖是一型和二型糖尿病的共同特征,是母体糖尿病导致胚胎畸形发生的主要影响因素<sup>[6-7]</sup>。在育龄妇女中,妊娠高血糖患病率的增加将导致糖尿病相关的胚胎畸形的增加比如NTDs畸形和心脏畸形等<sup>[8]</sup>。通过构建一型糖尿病和二型糖尿病胚胎畸形模型发现母体一型糖尿病或二型糖尿病都显著促进胚胎NTDs形成,并且具有共同的促NTDs形成的分子机制。在动物模型或者人体妊娠时使用胰岛素治疗糖尿病可以有效降低母体糖尿病诱导的胚胎畸形率。然而,要使患有一型或者二型糖尿病的妊娠母体维持正常血糖状态非常难。研究显示,即便有最好的产前护理条件,糖尿病母亲胚胎的NTDs概率也要比正常母亲的高出5倍<sup>[9]</sup>。因此,很有必要进一步探究母体糖尿病介导的胚胎NTDs形成的分子机制和调控靶点。

目前,广大科研工作者通过构建合理的糖尿病胚胎畸形模型,在母体糖尿病介导胚胎NTDs形成的机制研究领域已开展大量研究。研究发现,高糖处理后胚胎的背根神经节以及肢芽处的神经元发育都受到明显抑制,并且高糖对神经管背侧神经嵴细胞的迁移也有明显抑制作用<sup>[6]</sup>。WU等<sup>[10]</sup>的研究发现,一型糖尿病介导的胚胎NTDs发生率高于二型糖尿病介导的NTDs发生率;在进一步的分子机制研究中发现糖尿病母体胚胎中的氧化应激和内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)水平显著高于它们在正常胚胎组织中的水平,并且细胞内应激作用将进一步诱导胚胎神经上皮细胞凋亡<sup>[10]</sup>。此外,其他研究者也在探究妊娠糖尿病对神经上皮细胞增殖与凋亡平衡的影响,在得出与WU等一致的结论后,发现DM的胚胎神经上皮细胞的增殖水平和神经干细胞的增殖、代谢活性均低于其在正常胚胎中的水

平,证明神经上皮细胞的过度凋亡和增殖受阻与妊娠糖尿病引发的胚胎NTDs具有重要关联性<sup>[11]</sup>。以上研究均表明,母体糖尿病与胚胎NTDs的发生发展息息相关。

## 2 母体糖尿病对胚胎神经管畸形的调控机制

目前,已有大量研究从不同角度探索了母体糖尿病诱导胚胎NTDs发生的调控机制。研究发现胚胎神经上皮细胞凋亡、氧化应激、ERS、细胞自噬以及细胞早衰等机制是糖尿病介导胚胎NTDs形成的重要因素(图1)。本文将系统归纳总结母体糖尿病诱导胚胎NTDs形成的内在分子机制相关前沿研究进展。

### 2.1 细胞凋亡

细胞凋亡是细胞在特定信号诱导下遵循固定的程序,受一定基因调控的选择性细胞死亡过程。正常的细胞凋亡对胚胎发育和细胞更新等具有重要意义。大量研究发现在母体糖尿病胚胎中可观察到神经管上皮细胞显著凋亡<sup>[11-13]</sup>,提示神经上皮细胞过度凋亡与母体高血糖所诱导的胚胎NTDs形成具有重大相关性。进一步研究发现糖尿病所诱导的胚胎神经上皮细胞凋亡是由多种机制协同调控的(图2)。其中,线粒体功能障碍是细胞凋亡的重要诱导因素。研究发现编码PKC $\alpha$ 的*Prkca*基因敲除可抑制母体糖尿病所诱导的胚胎线粒体膜上促凋亡Bcl-2家族成员(Bak、Bax、Puma和Bim)的易位,同时降低其他线粒体功能障碍标记物的表达水平,证明敲除*Prkca*基因可预防母体糖尿病所诱导的胚胎线粒体功能障碍,抑制神经上皮细胞过度凋亡,减少NTDs发生<sup>[8,14]</sup>。过度的ERS也是细胞凋亡的重要机制。c-Jun氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路是ERS诱发细胞凋亡的重要途径。研究发现c-Jun N末端激酶1/2(c-Jun N-terminal kinases 1/2, JNK1/2)激活参与调控母体糖尿病诱导的细胞凋亡和NTDs形成<sup>[13,15]</sup>,*Jnk1/2*基因敲除可导致JNK1/2下游四种转录因子无法激活,从而抑制母体糖尿病所诱导的Caspase级联反应、神经前体细胞(neural precursor cells, NPCs)凋亡和胚胎NTDs形成<sup>[13,16]</sup>。此外,氧化应激也是糖尿病诱导胚胎神经上皮细胞凋亡的重要机制。研究发现在高糖诱导的胚胎NTDs中,高血糖所诱导的高水平NADPH可诱导胚胎神经上皮

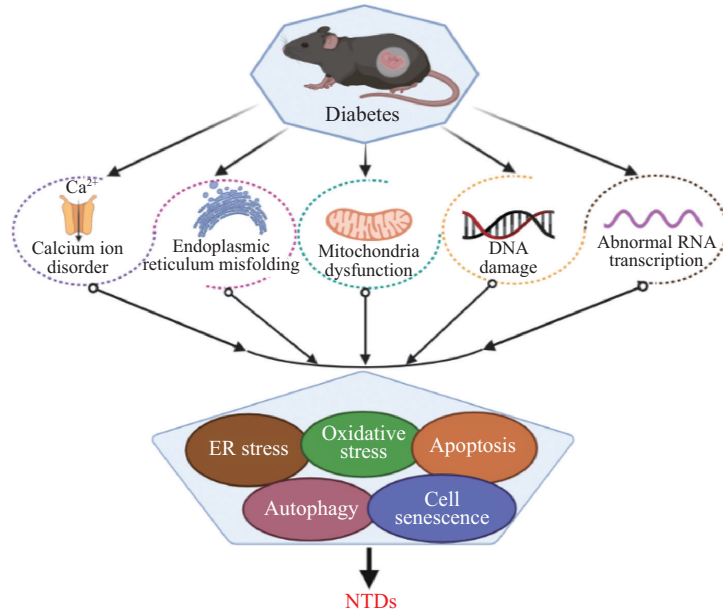


图1 母体糖尿病诱导胚胎NTDs形成的分子机制

Fig.1 The molecular mechanism of maternal diabetes-induced embryonic NTDs development

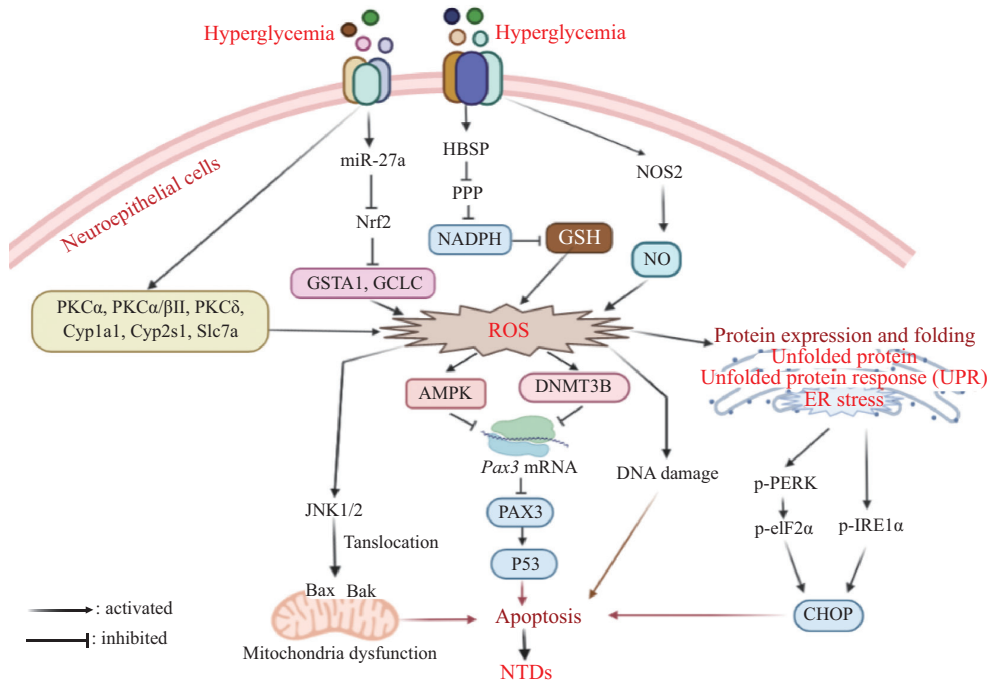


图2 母体糖尿病诱导胚胎组织细胞内应激作用的调控机制

Fig.2 The regulated mechanism of maternal diabetes on intracellular stress in embryos

细胞凋亡<sup>[17-18]</sup>。

## 2.2 氧化应激

众所周知,高血糖会破坏机体中活性氧(reactive oxygen species, ROS)和抗氧化剂之间的平衡稳态系统,诱导氧化应激。氧化应激是DM诱导相关并发症的重要机制。在胚胎发育过程中,胚胎中过度的

氧化应激水平会导致胚胎畸形、宫内发育迟缓或胎儿死亡等。有研究证实母体高血糖将导致胎盘代谢活动紊乱,促进蛋白激酶Ca(protein kinase Ca, *Pkca*)、蛋白激酶Ca/βII(protein kinase Ca/βII, *Pkca/βII*)、蛋白激酶C δ(protein kinase C δ, *Pkcd*)、细胞色素P4501A1(cytochrome P4501A1, *Cyp1a1*)、细胞

色素P450 2S1(cytochrome P450 2S1, *Cyp2s1*)、一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, *eNOS*)和溶质载体家族7成员2(solute carrier family 7 member 2, *Slc7a2*)等基因过表达, 改变线粒体的形态和功能, 促进ROS堆积<sup>[8,14,19]</sup>。母体糖尿病也会通过激活miR-27a, 抑制核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)及其所介导的抗氧化基因谷胱甘肽-S-转移酶A1(glutathione-S-transferase A1, *Gsta1*)和谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, *Gclc*)等的表达, 从而介导胚胎中高水平的氧化应激<sup>[20]</sup>。还有研究表明, 母体高血糖通过上调胚胎中的一氧化氮合酶2(nitric oxide synthase 2, NOS2)的表达, 提高一氧化氮(nitric oxide, NO)水平, 高水平的NO和相关的活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS)(如过氧亚硝酸盐)可进一步促进胚胎产生亚硝化和氧化应激作用<sup>[21-22]</sup>。此外, 也有研究证实母体高血糖促进葡萄糖通过葡萄糖转运蛋白2(glucose transporter 2, GLUT2)转运到胚胎细胞内, 葡萄糖摄取的增加也是诱导胚胎产生氧化应激的重要原因。具体过程如下: 过量的葡萄糖可增加己糖胺生物合成途径(hexosamine biosynthetic pathway, HBSP)的底物, 从而抑制磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)生成的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH), 并进一步降低还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)的生成, 最终诱导产生大量ROS; 而ROS的大量增加将进一步激活AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)和DNA甲基转移酶3B(DNA methyltransferase 3B, DNMT3B)<sup>[17]</sup>。在未分化的胚胎细胞中, DNMT3B使*Pax3*基因转录调节元件内胞嘧啶-鸟嘌呤岛上的胞嘧啶残基甲基化, 阻止*Pax3*转录表达。在母体高血糖情况下, 胚胎中的AMPK和DNMT3B高活性水平均可抑制*Pax3*基因的转录表达, 从而抑制PAX3蛋白表达水平, 最终增加p53的稳定性, 促进细胞周期停止和细胞凋亡(图2)。由上研究可见, PAX3是母体糖尿病激活氧化应激, 诱导胚胎神经管闭合异常的重要调控靶点<sup>[23]</sup>。此外, 母体糖尿病显著诱导胚胎组织中的DNA损伤。糖尿病母亲的新生儿中氧化核苷酸损伤标志物(8-羟基-2'-脱氧鸟苷)水平显著升高<sup>[24-25]</sup>。在进一步的机制研究中发现, 过度的氧化应激水平是母体糖尿病诱导胚胎DNA损伤的重要机制。研究发现超氧化

物歧化酶1(superoxide dismutase 1, SOD1)过表达可缓解母体糖尿病诱导的胚胎组织DNA损伤<sup>[26-27]</sup>。因此, 抑制氧化应激可能是缓解母体糖尿病介导的胚胎NTDs发生的重要措施。

### 2.3 内质网应激

内质网是细胞内的重要细胞器之一, 可对翻译后合成的蛋白质进行折叠、装配及转运。在正常生理条件下, 内质网能保持其极强的稳态系统, 从而保证细胞内蛋白质正常合成。但是在病毒感染、缺氧和高糖等刺激因素作用下, 内质网稳态系统被破坏, 导致钙离子平衡紊乱, 错误折叠和未折叠的蛋白质大量积累, 从而诱导细胞内ERS作用。在ERS早期, 机体可以通过未折叠蛋白反应, 缓解ERS; 但是在严重或者长时间的ERS作用下, 内质网功能严重受损, 并启动相关凋亡途径, 诱导细胞凋亡。

ERS是母体糖尿病诱导胚胎NTDs形成的重要机制。WU等<sup>[10]</sup>的研究发现与正常对照组相比, 糖尿病母鼠胚胎中p-PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、p-IRE1 $\alpha$ 和CHOP等ERS标记蛋白的表达显著上调(图2)。在体内外实验研究中进一步发现, 4-苯基丁酸(4-phenylbutyrate, 4-PBA)(ERS抑制剂)干预可缓解糖尿病诱导的胚胎组织以及神经干细胞中高水平的ERS作用, 胚胎NTDs发生率也明显下调<sup>[13,29-30]</sup>。肉豆蔻酰化富丙氨酸C激酶底物(myristoylated alanine-rich C-kinase substrate, MARCKS)是神经管闭合的重要调控蛋白。研究发现, 母体糖尿病可促进胚胎组织中MARCKS的乙酰化和磷酸化水平, 导致MARCKS与内质网脱离, 激活胚胎中的ERS水平; 抑制MARCKS磷酸化可逆转母体糖尿病诱导的胚胎神经上皮细胞内ERS和过度凋亡, 降低神经管缺陷概率<sup>[31]</sup>。

糖尿病是一个复杂的病理进程。糖尿病诱导胚胎NTDs形成的发病机制也并不是独立存在的, 而是形成一个调控网络, 互相影响。氧化应激在糖尿病胚胎NTDs的发病机制中起着核心作用。氧化应激可促进促凋亡蛋白Bcl-2家族成员Bax的表达, 并抑制抗凋亡蛋白Bcl-2的表达, 从而促进细胞凋亡。研究发现ERS可诱导氧化应激, 从而直接介导高糖对神经上皮细胞的促凋亡作用<sup>[32]</sup>。JNK1/2的激活可增加活性氧的产生, 诱导氧化应激<sup>[33]</sup>。在母体糖尿病胚胎畸形动物模型中发现, 糖尿病显著促进胚胎中ERS和JNK1/2的激活, 并且4-PBA刺激可阻断高糖诱导的JNK1/2及其下游效应因子的激活<sup>[13]</sup>。此外,

氧化应激也可以显著诱导ERS, 从而促进母体糖尿病胚胎NTDs形成。研究表明, JNK1/2的激活可通过破坏内质网钙稳态, 促进细胞内蛋白聚集物的形成, 从而诱导ERS<sup>[13]</sup>, 并且, JNK1/2基因敲除可显著抑制母体糖尿病胚胎中ERS水平, 从而缓解NTDs形成<sup>[13]</sup>。进一步研究也发现, SOD2过表达也是缓解母体糖尿病所诱导的胚胎ERS水平及其NTDs形成的重要途径<sup>[34]</sup>。由上可知, 在母体糖尿病诱导胚胎NTDs形成的调控网络中, 氧化应激和ERS是相互调控, 相互影响的。

## 2.4 细胞自噬

自噬是一个吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡, 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 降解其所包裹的内容物的过程。该过程实现了细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。哺乳动物细胞中存在3种自噬途径: 巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。巨自噬是最常见的自噬方式, 是真核细胞中起源于内质网的双层膜结构形成的自噬体包被蛋白质聚集、损伤或衰老的线粒体和过氧化物酶体等, 并将其转运到溶酶体进行消化降解的过程。

环境和激素刺激诱导发生的细胞自噬对胚胎发育过程中的细胞重构意义重大。在正常生理条件下, 自噬可降解受损的细胞器, 维持机体内环境稳定; 但过度活跃的自噬可能干扰细胞的生理过程, 甚至导致细胞死亡, 干扰正常的胚胎发育。FIMIA等<sup>[35]</sup>发现哺乳动物神经系统发育需要自噬, 当自噬功能损伤积累到一定程度时将导致胚胎NTDs的发生<sup>[35]</sup>。目前针对胚胎发育过程中, 糖尿病对胚胎组织中自噬水平的调控作用已开展大量研究。研究发现, 敲除编码自噬负调控因子PKC $\alpha$ 的*Prkca*基因和编码p70S6K1的*Rps6kb1*基因均可逆转糖尿病所诱导的细胞自噬功能损伤和细胞凋亡, 从而缓解NTDs形成; 进一步的研究发现PKC $\alpha$ 是通过抑制PGC-1 $\alpha$ 从而损伤神经上皮细胞的自噬以促进NTDs形成<sup>[8,36]</sup>。此外, 在糖尿病介导胚胎NTDs形成时, 过度活化的转录因子FoxO3a也是胚胎中自噬水平的重要调控因子, 其不仅可以抑制自噬激活因子(Ulk1、Becn1和Atg5)的表达, 也可以促进自噬抑制因子p62的表达。FoxO3a基因敲除可显著缓解糖尿病所介导的胚胎细胞自噬, 并抑制NTDs形成<sup>[37]</sup>。在神经系统疾病研究中发现,  $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synaptophysin,  $\alpha$ -Syn)、Parkin

和亨廷顿蛋白(huntington protein, HTT)等都能够神经上皮细胞形成过程中表达, 这些蛋白的大量聚集可能干扰细胞内信号转导, 影响神经上皮细胞的正常功能。此外, ZHAO等<sup>[38]</sup>的研究发现母体在糖尿病条件下, 胚胎神经细胞中聚集的Parkin蛋白与线粒体膜上的同源性磷酸酶张力蛋白(phosphatase and tensin homolog, PTEN)诱导蛋白激酶1(PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)相互作用, 导致胚胎中线粒体形态发生改变, 并激活自噬-溶酶体系统去除受损的线粒体。由此可见, Parkin聚集可能也是糖尿病母鼠调控胚胎中细胞自噬功能的重要机制, 从而干扰线粒体功能和蛋白质合成, 最终促进胚胎NTDs形成。综上所述, 母体高血糖所诱导的细胞自噬与胚胎NTDs形成密切相关, 而且糖尿病通过多种信号通路调控胚胎中细胞自噬水平。

## 2.5 巨噬细胞迁移

目前, 有研究证据表明极化的巨噬细胞(或前巨噬细胞)与胚胎神经管闭合存在一定联系。在胚胎发育早期, 前巨噬细胞来源于胚胎卵黄囊, 并穿过胚胎血管网络, 穿透不同的胚胎组织。大多数这些胚胎来源的巨噬细胞被极化为M2或M2样表型。这与来自肝脏或骨髓等部位的髓系细胞在神经孔关闭后才出现是不同的, 卵黄囊来源的前巨噬细胞在神经管关闭前一段时间内就出现, 而且在这一时期可保持在巨噬细胞前状态或分化为成熟的巨噬细胞形态<sup>[39-41]</sup>。有研究证据表明, 巨噬细胞或巨噬细胞样细胞可能在胚胎分化中发挥作用。在青蛙中, 巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)在胚胎神经组织中高水平表达; 当MIF被敲除, 巨噬细胞迁移到其他地方时, 原肠形成正常进行, 而神经元形成被抑制<sup>[42]</sup>。该研究提示, 巨噬细胞在神经形成过程中发挥至关重要的作用。进一步的研究发现, M2抗炎巨噬细胞或者更准确地说, M2样巨噬细胞或巨噬细胞祖细胞被认为是神经管发育和关闭的关键角色, 其能够直接或间接地与有助于发育中的胚胎结构完整性的因素(包括肌动蛋白、胶原蛋白和整合素等)相互作用, 从而作为一个中心机制统一所有胚胎神经闭合的调控因素间的作用<sup>[42]</sup>。因此, 巨噬细胞对神经管闭合所需结构蛋白的沉积、组织和调节的作用, 可进一步说明巨噬细胞与神经管闭合之间可能存在潜在的因果关系<sup>[42]</sup>, 并且肌动蛋白和胶原蛋白与巨噬细胞的直接或间接关系已经

被证实<sup>[42]</sup>。糖尿病环境可诱导机体的促炎反应。目前,有证据表明,糖尿病会降低巨噬细胞或前巨噬细胞的抗炎活性<sup>[43-44]</sup>。这可能也是糖尿病诱导胚胎神经管闭合失败的重要机制之一。

## 2.6 细胞衰老

除了细胞凋亡,细胞衰老也是糖尿病介导胚胎NTDs形成的重要机制。细胞衰老在衰老和与衰老相关的神经障碍、组织修复、肿瘤发生和心血管疾病等生理病理过程中发挥重要作用。胚胎发育过程中,细胞衰老是一种新发现的正常编程机制,它可以促进组织重塑并指导胚胎发育<sup>[45]</sup>。YANG等<sup>[46]</sup>研究发现,母体糖尿病可通过FoxO3a-miR-200c-ZEB1/2-Cp21/p27途径调控胚胎发育神经发生过程的转录和表观遗传学,从而启动神经上皮细胞衰老,促进胚胎NTDs形成<sup>[47]</sup>。作为细胞内重要转录因子,FoxO家族调节各种细胞功能,包括细胞增殖、凋亡和衰老等。在成体细胞中,FoxO家族成员对衰老有不同的调节作用。作为一种肿瘤抑制因子,FoxO4可以诱导癌细胞p21依赖性衰老<sup>[48]</sup>。而FoxO1是正常胚胎发育衰老的主要刺激因子<sup>[49]</sup>。但在母体糖尿病诱导胚胎NTDs形成分子机制研究中发现,母体糖尿病会激活胚胎神经上皮细胞中FoxO3a的转录活性,但不会激活FoxO1或FoxO4<sup>[47]</sup>。FoxO3a通过上调miR-200c直接触发神经上皮细胞衰老<sup>[50]</sup>;而且miR-200c也会沉默ZEB1和ZEB2的表达,逆转p21和p27抑制状态,从而协同诱导发育中的神经上皮细胞衰老<sup>[47]</sup>。因此,细胞衰老可能是预防和治疗母体糖尿病诱导胚胎NTDs形成的另一大突破口。

卵黄囊是一种胚胎外膜,与胚胎具有相同来源的祖细胞,它在支持胚胎发育方面起着重要作用<sup>[51]</sup>。在胚胎发育关键时期,啮齿动物卵黄囊包围胚胎,并作为原始胎盘,在胎盘形成之前,胚胎生长基本上取决于卵黄囊的正常发育<sup>[52]</sup>。人类卵黄囊结构异常与胚胎畸形有关。研究发现,妊娠前糖尿病可改变卵黄囊的生长和结构,提示研究糖尿病胚胎病变中卵黄囊的重要性<sup>[53]</sup>。在小鼠胚胎发育过程中,卵黄囊血管系统是第一个发育的系统,血管生成始于卵黄囊中胎儿肝激酶1(fetal liver kinase 1, Flk-1)祖细胞的出现,Flk-1祖细胞形成血岛,随后融合形成血管<sup>[54]</sup>。研究发现母体糖尿病诱发Flk-1祖细胞中的骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)下调,Flk-1祖细胞凋亡、血岛形成受损以及Flk-1祖细

胞数和血管密度降低,导致卵黄囊血管病变,最终导致胚胎畸形或致死<sup>[55]</sup>。因此,糖尿病引起的血管系统缺陷也与胚胎NTDs形成息息相关。

## 3 母体糖尿病诱导的胚胎神经管畸形的治疗研究

基于母体糖尿病诱导胚胎NTDs形成的分子机制研究,目前广大科研工作者通过构建糖尿病胚胎畸形动物模型,开展大量靶向保护胚胎免受母体高血糖损伤的干预措施相关研究。具体研究进展如下。

### 3.1 叶酸

叶酸是机体正常生长发育所必需的水溶性B族维生素,能为体内广泛的甲基化反应提供甲基供体,促进DNA甲基化反应,从而预防NTDs<sup>[56]</sup>。诸多研究表明,母亲围孕期叶酸的消耗量同子代NTDs的发生密切相关。叶酸干预组畸形发生率较正常无干预组的畸形率低,证实叶酸在一定程度上保护神经管正常发育,减小NTDs风险<sup>[57]</sup>。有证据表明,与围孕期使用维生素或含有叶酸补充剂的母体后代相比,母体糖尿病且围孕期未使用维生素的母亲后代出生缺陷的风险至少高出2倍<sup>[58]</sup>。因此,叶酸可能是预防母体糖尿病诱导的胚胎NTDs的重要策略。

### 3.2 雷帕霉素

雷帕霉素在缓解糖尿病诱导的胚胎NTDs发生中具有重大潜能。XU等<sup>[47]</sup>的研究发现,经雷帕霉素处理的糖尿病孕鼠其胚胎的NTDs发生率明显低于未经雷帕霉素处理的糖尿病孕鼠胚胎NTDs的发生率。雷帕霉素治疗可降低母体糖尿病胚胎中 $\beta$ 半乳糖苷酶(senescence-associated beta galactosidase, Sa $\beta$ G)、 $\gamma$ H2AX和三甲基化组蛋白3赖氨酸9(trimethylated histone 3 lysine 9, H3K9me3)信号,并恢复胚胎发育中神经形成期时神经上皮细胞增殖标记磷酸化组蛋白H3(phospho-histone H3, p-H3)含量<sup>[47,59]</sup>。此外,雷帕霉素不仅可以显著减少胚胎神经上皮细胞的凋亡数量<sup>[47]</sup>,而且在上皮细胞向间充质细胞转化过程中雷帕霉素也可以抑制miR-200c表达,增加ZEB1/2的表达水平,从而缓解糖尿病母体胚胎的细胞衰老<sup>[47]</sup>。以上研究可知,雷帕霉素可能是缓解母体糖尿病所诱导的胚胎NTDs形成的潜在药物。

### 3.3 二甲双胍

二甲双胍是一种典型的二型糖尿病治疗药物。WU等<sup>[10]</sup>的研究探究了二甲双胍在二型糖尿病胚胎

NTDs中的调控作用。研究发现与正常组对比,二甲双胍可以有效缓解高脂组小鼠肝脏中的糖异生,使二型糖尿病小鼠高血糖正常化<sup>[28]</sup>;并且二甲双胍可改善胚胎组织的细胞内应激作用及其神经上皮细胞凋亡水平,从而显著缓解母体糖尿病所介导的胚胎NTDs产生<sup>[28]</sup>。然而,二甲双胍治疗只能部分预防葡萄糖耐受不良,二甲双胍对葡萄糖代谢缺陷的不完全纠正仍可能导致短暂的高血糖状态。因此,二甲双胍对母体糖尿病所介导的胚胎NTDs的作用仍需要进一步探究。

### 3.4 海藻糖

海藻糖是一种富含于多种水果和蔬菜的天然双糖,是植物和真菌中葡萄糖和氮能量来源的双糖。母体糖尿病可降低胚胎神经上皮细胞中LC3-II表达水平和自噬体数量,抑制胚胎细胞的自噬水平;而海藻糖给药治疗可逆转母体糖尿病介导的胚胎细胞自噬损伤,缓解胚胎NTDs<sup>[60]</sup>。进一步的机制研究发现海藻糖还可以缓解糖尿病母鼠胚胎细胞的线粒体功能障碍、ERS、细胞凋亡和神经发生延迟等,从而缓解NTDs形成<sup>[60]</sup>。这些研究将为开发海藻糖作为母体糖尿病诱导的胚胎NTDs发生的潜在治疗药物提供理论证据。

### 3.5 黄酮类化合物、姜黄素类和芪类

研究发现天然产物包括黄酮类化合物(槲皮素、异槲皮素和芦丁)、姜黄素类(如姜黄素和去甲氧基姜黄素)和芪类(如白藜芦醇和二氢白藜芦醇)等也是糖尿病胚胎畸形的潜在治疗药物<sup>[61-62]</sup>。例如姜黄素,这是一种从姜黄根部提取出来的天然多酚,具有抗氧化和抗肿瘤等作用。在体外胚胎培育中发现,姜黄素能够抑制高糖条件下胚胎组织的氧化应激和亚硝化应激反应,减少细胞凋亡数量,改善高糖所诱导的胚胎NTDs<sup>[10]</sup>。白藜芦醇可修复糖尿病引起的维甲酸受体、维甲酸X受体和丝裂原活化蛋白激酶表达受损,所有的这些信号在胚胎发育过程中起着至关重要的作用<sup>[63]</sup>。

### 3.6 抗氧化剂和iNOS抑制剂

氧化应激是母体糖尿病诱导胚胎畸形的重要机制。基于氧化应激的调控作用,研究发现维生素A、维生素E、*N*-乙酰半胱氨酸、硫辛酸和麦角硫辛酸等抗氧化剂均能缓解糖尿病母鼠胚胎的氧化应激作用,从而减少胚胎NTDs发生<sup>[64]</sup>。此外,为了探究胚胎中亚硝化应激的作用,iNOS抑制剂L-N6-(1氨

基乙基)-赖氨酸[L-N6-(1-iminoethyl)-lysine]也被用于治疗糖尿病妊娠小鼠。研究发现该iNOS抑制剂可降低NTDs的发生率<sup>[65]</sup>。此外,天然多酚也具有iNOS抑制特性。研究发现,槲皮素(一种天然植物化学物质,其中的天然多酚可缓解胚胎组织的亚硝化)也可以有效缓解糖尿病母鼠胚胎NTDs<sup>[66]</sup>。进一步的研究发现,槲皮素衍生物槲皮素-3-葡萄糖苷治疗可通过调节核因子B转录水平,抑制NOS2的表达,增加SOD1,从而减轻亚硝化、氧化和ERS等作用,减少糖尿病小鼠胚胎NTDs发生<sup>[67]</sup>。

### 3.7 肌肌醇(myo-inositol, MI)和花生四烯酸

研究发现,在糖尿病胚胎畸形病中,高血糖会显著诱导细胞中山梨醇的生成,并伴随MI浓度的降低<sup>[68]</sup>。进一步研究发现,醛糖还原酶抑制剂治疗未能纠正MI的减少,不能预防胚胎畸形发生,并发现醛糖还原酶抑制剂有明显的副作用;相比之下,补充MI可降低NTDs的发生率,表明MI参与调控糖尿病胚胎病变的发生发展过程<sup>[69]</sup>。此外,花生四烯酸也参与脂质代谢过程。抑制ROS所诱导的脂质过氧化,从而降低胚胎NTDs形成的发生率<sup>[70]</sup>。卵黄囊血管病变也与花生四烯酸和肌醇的异常有关。膳食中补充脂肪酸可恢复卵黄囊中的脂质水平,从而减少糖尿病引起的胚胎畸形<sup>[71]</sup>。

### 3.8 骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)

此外,在胚胎发育早期,BMSCs治疗也可能实现NTDs后的胚胎功能恢复。在离体大鼠胚胎NTDs模型中发现,注射到羊膜腔的BMSCs可自发迁移到有缺陷的神经组织中<sup>[72]</sup>。进一步用RNA-seq探索BMSCs自发迁移到缺陷神经管的关键调控基因的表达水平,发现NTD胚胎中显著上调的迁移相关基因与细胞运动和细胞间黏附有关<sup>[72]</sup>。而且,植入的BMSCs可进一步特异性分化为缺陷组织的细胞类型,包括皮肤和不同类型的原位神经元<sup>[72]</sup>。基于以上结果,BMSCs治疗可能是一种新的有效缓解胚胎NTDs的策略,当然这有待进一步探索。

## 4 总结与展望

NTDs是一种严重的出生缺陷,给患儿家庭及社会造成了巨大的经济负担。母体糖尿病可显著诱导胚胎NTDs的形成,在该过程中,胚胎发育受氧化应激、ERS、神经上皮细胞过度凋亡以及细胞自噬

和细胞早衰等分子机制调控, 并且这些调控机制在该过程中形成一个调控网络, 互相影响、相互调控, 共同调控母体糖尿病诱导的胚胎NTDs形成。基于以上机制的研究, 科学家们在母体糖尿病诱导胚胎NTDs形成的治疗策略方面也开始了众多探索, 并取得了一定研究进展。糖尿病自身是个复杂的病理因素。因此, 糖尿病调控胚胎发育的过程也是相当复杂。所以, 糖尿病诱导NTDs形成的分子机制研究及潜在治疗靶点的探索工作仍任重道远。

### 参考文献 (References)

- [1] AU K S, FINDLEY T O, 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): 3042-57.
- [2] Practice Bulletin No. 187: Neural tube defects [J]. *Obstet Gynecol*, 2017, 130(6): e279-e90.
- [3] ZHANG Q, BAI B, MEI X, et al. Elevated H3K79 homocysteinylation causes abnormal gene expression during neural development and subsequent neural tube defects [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3436.
- [4] CAVALLI P. Prevention of neural tube defects and proper folate periconceptional supplementation [J]. *J Prenat Med*, 2008, 2(4): 40-1.
- [5] ZAGANJOR I, SEKKARIE A, TSANG B L, et al. Describing the prevalence of neural tube defects worldwide: a systematic literature review [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0151586.
- [6] KIM G, CAO L, REECE E A, et al. Impact of protein O-GlcNAcylation on neural tube malformation in diabetic embryopathy [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11107.
- [7] MAREI W F A, BOSCH L V D, PINTELON I, et al. Mitochondria-targeted therapy rescues development and quality of embryos derived from oocytes matured under oxidative stress conditions: a bovine *in vitro* model [J]. *Hum Reprod*, 2019, 34(10): 1984-98.
- [8] WANG F, XU C, REECE E A, et al. Protein kinase C- $\alpha$  suppresses autophagy and induces neural tube defects via miR-129-2 in diabetic pregnancy [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15182.
- [9] CORREA A, GILBOA S M, BESSER L M, et al. Diabetes mellitus and birth defects [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2008, 199(3): 237.e1-9.
- [10] WU Y, WANG F, REECE E A, et al. Curcumin ameliorates high glucose-induced neural tube defects by suppressing cellular stress and apoptosis [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 212(6): 802.e1-8.
- [11] LI K, SHI Y, ZHU S, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids effectively protect against neural tube defects in diabetic mice induced by streptozotocin [J]. *Food Funct*, 2021, 12(19): 9188-96.
- [12] BAI B, ZHANG Q, WAN C, et al. CBP/p300 inhibitor C646 prevents high glucose exposure induced neuroepithelial cell proliferation [J]. *Birth Defects Res*, 2018, 110(14): 1118-28.
- [13] LI X, XU C, YANG P. c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 and endoplasmic reticulum stress as interdependent and reciprocal causation in diabetic embryopathy [J]. *Diabetes*, 2013, 62(2): 599-608.
- [14] YANG P, REECE E A, WANG F, et al. Decoding the oxidative stress hypothesis in diabetic embryopathy through proapoptotic kinase signaling [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 212(5): 569-79.
- [15] LI X, WENG H, XU C, et al. Oxidative stress-induced JNK1/2 activation triggers proapoptotic signaling and apoptosis that leads to diabetic embryopathy [J]. *Diabetes*, 2012, 61(8): 2084-92.
- [16] CHEN Y, CHEN P, LIN C, et al. Cantharidic acid induces apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells through p38-mediated upregulation of caspase activation [J]. *Environ Toxicol*, 2020, 35(5): 619-27.
- [17] LOEKEN M R. Mechanisms of congenital malformations in pregnancies with pre-existing diabetes [J]. *Curr Diab Rep*, 2020, 20(10): 54.
- [18] LIU Y, GU H, HUANG T, et al. miR-322 treatment rescues cell apoptosis and neural tube defect formation through silencing NADPH oxidase 4 [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2020, 26(9): 902-12.
- [19] HOSNI A, EL-TWAB S A, ABDUL-HAMID M, et al. Cinnamaldehyde mitigates placental vascular dysfunction of gestational diabetes and protects from the associated fetal hypoxia by modulating placental angiogenesis, metabolic activity and oxidative stress [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 165: 105426.
- [20] ZHAO Y, DONG D, REECE E A, et al. Oxidative stress-induced miR-27a targets the redox gene nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in diabetic embryopathy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2018, 218(1): 136.e1-10.
- [21] CAO L, TAN C, MENG F, et al. Amelioration of intracellular stress and reduction of neural tube defects in embryos of diabetic mice by phytochemical quercetin [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21491.
- [22] SHAHANI N, SAWA A. Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(8): 1493-504.
- [23] ALCALA M, BOLADO V E, SANCHEZ-VERA I, et al. Prevention of teratogenesis in pregnancies of obese rats by vitamin E supplementation [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(8): 1173.
- [24] GELALETI R B, DAMASCENO D C, SALVADORI D M, et al. IRS-1 gene polymorphism and DNA damage in pregnant women with diabetes or mild gestational hyperglycemia [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2015, 7: 30.
- [25] CASTILLA-PEON M F, MEDINA BRAVO P G, SANCHEZ-URBINA R, et al. Diabetes and obesity during pregnancy are associated with oxidative stress genotoxicity in newborns [J]. *J Perinat Med*, 2019, 47(3): 347-53.
- [26] DONG D, YU J, WU Y, et al. Maternal diabetes triggers DNA damage and DNA damage response in neurulation stage embryos through oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(2): 407-12.
- [27] FITRIASARI S, TRAINOR P A. Diabetes, oxidative stress, and DNA damage modulate cranial neural crest cell development and the phenotype variability of craniofacial disorders [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 644410.
- [28] WU Y, WANG F, FU M, et al. Cellular stress, excessive apoptosis, and the effect of metformin in a mouse model of type 2 diabetic embryopathy [J]. *Diabetes*, 2015, 64(7): 2526-36.
- [29] GU H, YU J, DONG D, et al. High glucose-repressed CITED2 expression through miR-200b triggers the unfolded protein response and endoplasmic reticulum stress [J]. *Diabetes*, 2016, 65(1): 149-63.



- [30] CHEN X, ZHONG J, DONG D, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced CHOP inhibits PGC-1 $\alpha$  and causes mitochondrial dysfunction in diabetic embryopathy [J]. *Toxicol Sci*, 2017, 158(2): 275-85.
- [31] YANG P, XU C, REECE E A, et al. Tip60- and sirtuin 2-regulated MARCKS acetylation and phosphorylation are required for diabetic embryopathy [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 282.
- [32] KIM H R, LEE G H, CHO E Y, et al. Bax inhibitor 1 regulates ER-stress-induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1 [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(8): 1126-33.
- [33] VENTURA J J, COGSWELL P, FLAVELL R A, et al. JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(23): 2905-15.
- [34] ZHONG J, XU C, GABBAY-BENZIV R, et al. Superoxide dismutase 2 overexpression alleviates maternal diabetes-induced neural tube defects, restores mitochondrial function and suppresses cellular stress in diabetic embryopathy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 96: 234-44.
- [35] FIMIA G M, STOYKOVA A, ROMAGNOLI A, et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system [J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1121-5.
- [36] CAO S, SHEN W, REECE E A, et al. Deficiency of the oxidative stress-responsive kinase p70S6K1 restores autophagy and ameliorates neural tube defects in diabetic embryopathy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2020, 223(5): 753.e1-14.
- [37] XU C, CHEN X, REECE E A, et al. The increased activity of a transcription factor inhibits autophagy in diabetic embryopathy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2019, 220(1): 108.e1-12.
- [38] ZHAO Z, CAO L, REECE E A. Formation of neurodegenerative aggresome and death-inducing signaling complex in maternal diabetes-induced neural tube defects [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(17): 4489-94.
- [39] STREMMEL C, SCHUCHERT R, WAGNER F, et al. Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 75.
- [40] YOSEF N, VADAKKAN T J, PARK J H, et al. The phenotypic and functional properties of mouse yolk-sac-derived embryonic macrophages [J]. *Dev Biol*, 2018, 442(1): 138-54.
- [41] O'RAHILLY R, MULLER F. Neurulation in the normal human embryo [J]. *Ciba Found Symp*, 1994, 181: 70-82.
- [42] BLOCK J. M2-like cells from the macrophage lineage might play a central role in closure of the embryonic neural tube [J]. *Med Hypotheses*, 2019, 129: 109264.
- [43] BONIAKOWSKI A E, KIMBALL A S, JACOBS B N, et al. Macrophage-mediated inflammation in normal and diabetic wound healing [J]. *J Immunol*, 2017, 199(1): 17-24.
- [44] WANG P, MA Z, WANG Z, et al. MiR-6869-5p induces M2 polarization by regulating PTPRO in gestational diabetes mellitus [J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 6696636.
- [45] STORER M, MAS A, ROBERT-MORENO A, et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning [J]. *Cell*, 2013, 155(5): 1119-30.
- [46] YANG P, LI X, XU C, et al. Maternal hyperglycemia activates an ASK1-FoxO3a-caspase 8 pathway that leads to embryonic neural tube defects [J]. *Sci Signal*, 2013, 6(290): ra74.
- [47] XU C, SHEN W, REECE E A, et al. Maternal diabetes induces senescence and neural tube defects sensitive to the senomorphic rapamycin [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(27): eabf5089.
- [48] SUN X, THORNE R F, ZHANG X, et al. LncRNA GUARDIN suppresses cellular senescence through a LRP130-PGC1 $\alpha$ -FOXO4-p21-dependent signaling axis [J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(4): e48796.
- [49] KURAKAZU I, AKASAKI Y, HAYASHIDA M, et al. FOXO1 transcription factor regulates chondrogenic differentiation through transforming growth factor  $\beta$ 1 signaling [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(46): 17555-69.
- [50] LIU C, HU W, LI L, et al. Roles of miR-200 family members in lung cancer: more than tumor suppressors [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(27): 2875-86.
- [51] CARNEY E W, SCIALLI A R, WATSON R E, et al. Mechanisms regulating toxicant disposition to the embryo during early pregnancy: an interspecies comparison [J]. *Birth Defects Res C*, 2004, 72(4): 345-60.
- [52] BARON M H. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis [J]. *Exp Hematol*, 2003, 31(12): 1160-9.
- [53] BERDAHL D M, BLAIN J, VAN VOORHIS B, et al. Detection of enlarged yolk sac on early ultrasound is associated with adverse pregnancy outcomes [J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(4): 1535-7.
- [54] DRAKE C J, FLEMING P A. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo [J]. *Blood*, 2000, 95(5): 1671-9.
- [55] CAO S, REECE E A, SHEN W, et al. Restoring BMP4 expression in vascular endothelial progenitors ameliorates maternal diabetes-induced apoptosis and neural tube defects [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 859.
- [56] ODURO P K, ZHENG X, WEI J, et al. The cGAS-STING signaling in cardiovascular and metabolic diseases: future novel target option for pharmacotherapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(1): 50-75.
- [57] KAMURA S, SASAKI A, OGAWA K, et al. Periconceptional folic acid intake and disturbing factors: a single-center study in Japan [J]. *Congenit Anom*, 2022, 62(1): 42-6.
- [58] CORREA A, GILBOA S M, BOTTO L D, et al. Lack of periconceptional vitamins or supplements that contain folic acid and diabetes mellitus-associated birth defects [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 206(3): 218.e1-13.
- [59] POSPELOVA T V, LEONTIEVA O V, BYKOVA T V, et al. Suppression of replicative senescence by rapamycin in rodent embryonic cells [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(12): 2402-7.
- [60] XU C, LI X, WANG F, et al. Trehalose prevents neural tube defects by correcting maternal diabetes-suppressed autophagy and neurogenesis [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 305(5): E667-78.
- [61] HAN L, JIANG Z, ZHENG X, et al. Progress in development of interventions to prevent birth defects in diabetic pregnancies [J]. *Chem Pharm Bull*, 2019, 67(7): 648-53.
- [62] ZHONG J, XU C, REECE E A, et al. The green tea polyphenol EGCG alleviates maternal diabetes-induced neural tube defects by inhibiting DNA hypermethylation [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, doi: 10.1016/j.ajog.2016.03.009.
- [63] SINGH C K, KUMAR A, LAVOIE H A, et al. Diabetic complications in pregnancy: is resveratrol a solution [J]? *Exp Biol Med*, 2013, 238(5): 482-90.
- [64] WENTZEL P, ERIKSSON U J. Antioxidants diminish develop-

- mental damage induced by high glucose and cyclooxygenase inhibitors in rat embryos *in vitro* [J]. *Diabetes*, 1998, 47(4): 677-84.
- [65] ZHAO Z, ECKERT R L, REECE E A. Reduction in embryonic malformations and alleviation of endoplasmic reticulum stress by nitric oxide synthase inhibition in diabetic embryopathy [J]. *Reprod Sci*, 2012, 19(8): 823-31.
- [66] DAS S, ROY P, MONDAL S, et al. One pot synthesis of gold nanoparticles and application in chemotherapy of wild and resistant type visceral leishmaniasis [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 107: 27-34.
- [67] TAN C, MENG F, REECE E A, et al. Modulation of nuclear factor- $\kappa$ B signaling and reduction of neural tube defects by quercetin-3-glucoside in embryos of diabetic mice [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2018, doi: 10.1016/j.ajog.2018.04.045.
- [68] SUSSMAN I, MATSCHINSKY F M. Diabetes affects sorbitol and myo-inositol levels of neuroectodermal tissue during embryogenesis in rat [J]. *Diabetes*, 1988, 37(7): 974-81.
- [69] GUO J, SHI Y, XU C, et al. Quantification of plasma myo-inositol using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 460: 88-92.
- [70] ORNOY A, KOREN G, YANAI J. Is post exposure prevention of teratogenic damage possible: studies on diabetes, valproic acid, alcohol and anti folates in pregnancy: animal studies with reflection to human [J]. *Reprod Toxicol*, 2018, 80: 92-104.
- [71] REECE E A, HOMKO C J, WU Y, et al. The role of free radicals and membrane lipids in diabetes-induced congenital malformations [J]. *J Soc Gynecol Investig*, 1998, 5(4): 178-87.
- [72] WEI X, MA W, GU H, et al. Transamniotic mesenchymal stem cell therapy for neural tube defects preserves neural function through lesion-specific engraftment and regeneration [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 523.