

p,p'-DDE 对胰岛素瘤细胞 H19 差异甲基化区甲基化及胰岛素分泌的影响

宗艳秋, 谢华森, 李晓青, 王莉君, 杨磊, 宋杨

杭州师范大学, 浙江 杭州 310016



DOI 10.11836/JEOM21394

摘要:

[背景] 糖尿病是全球重要的公共卫生问题。研究表明二氯二苯基二氯乙烷(p,p'-DDE)与2型糖尿病的发病密切相关,然而相关分子机制尚不清楚。

[目的] 探讨 p,p'-DDE 对大鼠胰岛素瘤细胞(INS-1 细胞)H19 差异甲基化区(DMR)甲基化及胰岛素分泌的影响。

[方法] 用不同浓度的 p,p'-DDE(0、3.125、6.25、12.5、25、50、75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)染毒 INS-1 细胞 24 h,采用 CCK-8 法检测 INS-1 细胞活力;以 0、12.5、25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 作为后续实验浓度,染毒 24 h。采用亚硫酸氢盐修饰测序法检测 H19 DMR 24 个 CpG 位点甲基化水平;采用实时荧光定量 PCR 检测胰岛素样生长因子 2(IGF2)基因转录水平;采用 Western blotting 检测 IGF2 和 1 型胰岛素样生长因子受体(IGF1R)蛋白水平;采用葡萄糖刺激胰岛素分泌实验测定 INS-1 细胞胰岛素分泌功能(高糖和低糖浓度分别为 5、25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

[结果] 与对照组相比,12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 增加 INS-1 细胞活力,然而,50、75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 抑制细胞活力($P<0.01$),故本研究选择 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最高染毒浓度。25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 暴露导致 H19 DMR CpG18、CpG22~CpG24 位点甲基化水平下调,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 暴露导致 H19 DMR CpG10~CpG24 位点甲基化水平下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。不同浓度(12.5、25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) p,p'-DDE 均可下调胰岛细胞 IGF2 mRNA、蛋白表达和 IGF1R 蛋白表达,IGF2 转录水平分别降低为对照组的 67.8%、68.6%、62.5%,蛋白水平分别降低为对照组的 73.3%、79.5%、80.9%,IGF1R 蛋白水平分别降低为对照组的 54.8%、25.6%、12.9%($P<0.01$)。在高糖环境(25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖)下,不同浓度 p,p'-DDE 均抑制胰岛素分泌水平,分别降低为对照组的 85.0%、58.6%、49.5%($P<0.01$)。

[结论] p,p'-DDE 下调胰岛细胞 H19 DMR 甲基化水平,干扰 IGF2/IGF1R 信号通路,导致胰岛素分泌功能障碍。

关键词: 二氯二苯基二氯乙烷;糖尿病;胰岛功能;H19;DNA 甲基化;胰岛素样生长因子 2;1 型胰岛素样生长因子受体

Effects of p,p'-DDE on H19 DMR methylation and insulin secretion of INS-1 cells ZONG Yanqiu, XIE Huasen, LI Xiaoqing, WANG Lijun, YANG Lei, SONG Yang (Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310016, China)

Abstract:

[Background] Diabetes is a major threat to public health across the world. Studies have shown that exposure to p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) is closely related to the occurrence of type 2 diabetes mellitus. However, the relevant molecular mechanism is not clear.

[Objective] To investigate the effects of p,p'-DDE on H19 differentially methylated region (DMR) methylation and insulin secretion of rat insulinoma cells (INS-1 cells).

[Methods] INS-1 cells were cultured with different concentrations (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of p,p'-DDE for 24 h, and the viability of INS-1 cells was detected by CCK-8 method. INS-1 cells were exposed to 0, 12.5, 25, and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE for 24 h in subsequent experiments. The methylation levels of 24 CpG sites in H19 DMR were analyzed by bisulfite genomic sequencing. The expression levels of insulin-like growth factor 2 (IGF2) mRNA were detected by real-time quantitative PCR. The expression levels of IGF2 and insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) proteins were detected by Western blotting. The insulin secretion

基金项目

国家自然科学基金项目(81102161,81573196);浙江省自然科学基金(LY14H260004);浙江省公益技术研究计划(LGD19H260001)

作者简介

宗艳秋(1994—),女,硕士生;
E-mail: zongyanqiu123@163.com

通信作者

宋杨, E-mail: sygp_0@163.com

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-08-29

录用日期 2022-02-10

文章编号 2095-9982(2022)05-0539-06

中图分类号 R11

文献标志码 A

►引用

宗艳秋, 谢华森, 李晓青, 等. p,p'-DDE 对胰岛素瘤细胞 H19 差异甲基化区甲基化及胰岛素分泌的影响 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(5): 539-544.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21394

Funding

This study was funded.

Correspondence to

SONG Yang, E-mail: sygp_0@163.com

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2021-08-29

Accepted 2022-02-10

► To cite

ZONG Yanqiu, XIE Huasen, LI Xiaoqing, et al. Effects of p,p'-DDE on H19 DMR methylation and insulin secretion of INS-1 cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(5): 539-544.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21394

function of INS-1 cells was determined by glucose-stimulated insulin secretion test (5 and 25 mmol·L⁻¹ glucose, respectively).

[Results] Compared with the control group, the viability of INS-1 cells increased significantly after treatment with 12.5 μmol·L⁻¹ p,p'-DDE; however, it was significantly inhibited after treatment with 50 or 75 μmol·L⁻¹ p,p'-DDE ($P < 0.01$); therefore, 50 μmol·L⁻¹ was chosen as the maximum concentration of exposure for subsequent experiments. The 25 μmol·L⁻¹ p,p'-DDE treatment decreased the methylation levels of CpG18 and CpG22-CpG24 sites in *H19* DMR, and the 50 μmol·L⁻¹ p,p'-DDE treatment decreased the methylation levels of CpG10-CpG24 sites ($P < 0.05$ or $P < 0.05$). Multiple concentrations (12.5, 25, and 50 μmol·L⁻¹) of p,p'-DDE down-regulated the mRNA and protein relative expression levels of *IGF2* and the protein relative expression levels of IGF1R. The transcription level of *IGF2* decreased to 67.8%, 68.6%, and 62.5% of the control group, the protein level of IGF2 decreased to 73.3%, 79.5%, and 80.9% of the control group, and the protein level of IGF1R decreased to 54.8%, 25.6%, and 12.9% of the control group, respectively ($P < 0.01$). In the high glucose context, p,p'-DDE at selected concentrations inhibited the insulin secretion levels to 85.0%, 58.6%, and 49.5% of the control group, respectively ($P < 0.01$).

[Conclusion] p,p'-DDE could down-regulate methylation level of *H19* DMR, interfere the IGF2/IGF1R signaling pathway, and inhibit insulin secretion of islet cells.

Keywords: p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene; diabetes; islet function; *H19*; DNA methylation; insulin-like growth factor 2; insulin-like growth factor-1 receptor

糖尿病是一种因胰岛素分泌不足,和(或)对胰岛素敏感性降低而引起的代谢性疾病^[1]。2019年,国际糖尿病联盟显示,全世界20~79岁的成年人中有4.63亿人患有糖尿病,约占该年龄段所有成年人的9.3%,糖尿病已成为危害全球人民健康的重要慢性非传染性疾病之一^[2]。传统观念认为,糖尿病的发生发展与遗传、不良生活习惯等密切相关。近年来不断有研究表明,环境污染物发挥着重要作用。

二氯二苯基二氯乙烷(p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene, p,p'-DDE)是有机氯农药滴滴涕(dichlorodiphenyltrichloroethane, DDT)分解产生的主要代谢产物^[3],是DDT类化合物在环境中长期残留的生物标志物。尽管许多国家已明令禁止DDT的使用,世界卫生组织仍建议将DDT用于室内喷洒以控制疟疾病媒。p,p'-DDE作为一种环境内分泌干扰物,具有持久性、蓄积性和高毒性的特征,导致其暴露的危害仍然存在。多项研究证实, p,p'-DDE可增加2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的发生风险^[4-5],同时,体外研究表明,不同浓度p,p'-DDT(10^{-12} ~ 10^{-6} mol·L⁻¹)处理大鼠胰岛素瘤细胞(INS-1E细胞)48 h均可导致细胞胰岛素分泌水平降低,然而其中分子机制尚不清楚^[6]。

越来越多研究表明,表观遗传修饰在糖尿病的发生发展中发挥重要作用。DNA甲基化是一种主要的表观遗传机制,在DNA甲基化转移酶的作用下,将甲基(-CH₃)选择性添加到胞嘧啶的第5位碳原子上。胰岛素样生长因子2(insulin-like growth factor 2, IGF2)及其交互基因*H19*是最早发现的印记基因,可通过对差异甲基化区(differentially methylated region, DMR)进行DNA甲基化修饰来调节等位基因的不对称表达^[3]。

IGF2是调节胰岛β细胞的质量和功能的关键蛋白^[7], IGF2通过自分泌方式结合1型胰岛素样生长因子受体(insulin-like growth factor-1 receptor, IGF1R),保护胰岛β细胞免受凋亡^[8]。

INS-1细胞作为一种哺乳动物类大鼠细胞系,可以在不同的葡萄糖浓度下储存和分泌胰岛素^[9],与正常胰岛细胞对葡萄糖刺激的胰岛素分泌的反应相似,被广泛应用于研究胰岛素分泌机制。基于此,本实验选择INS-1细胞为研究对象,探讨p,p'-DDE对INS-1细胞*H19* DMR甲基化及胰岛素分泌水平的影响与机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 大鼠胰岛素瘤细胞(INS-1细胞)由华中科技大学李和教授馈赠。

1.1.2 主要试剂与仪器 RPMI 1640培养基、胎牛血清(BI, 以色列), β-巯基乙醇(Sigma, 美国), p,p'-DDE(Sigma, 美国), CCK-8(GLPBIO, 美国), Trizol试剂(Thermo Fisher, 美国), EZ DNA甲基化试剂盒-Gold®(ZYMO RESEARCH, 美国), 热启动酶(TaKaRa, 中国), 兔抗IGF2单克隆抗体(Abcam, 英国), 兔抗IGF1R单克隆抗体(Cell Signaling Technology, 美国), 鼠抗β-actin单克隆抗体(中杉金桥, 中国), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG(中杉金桥, 中国), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(中杉金桥, 中国), BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天, 中国), ECL发光液(Bio-Rad, 美国), 大鼠超敏胰岛素ELISA检测试剂盒(ALPCO, 美国), KRBH缓冲液(杭州泽衡生物科技有限公司, 中国)。台式高速离

离心机(上海力申科学仪器有限公司, 中国), 湿转蛋白转膜仪(Bio-Rad, 美国), 垂直电泳槽(Bio-Rad, 美国), SpectraMax 190 酶标仪(Thermo Fisher, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 INS-1 细胞常规接种于 RPMI 1640 完全培养基 [含 10% (体积分数) 胎牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 mg·mL⁻¹ 链霉素和 50 μmol·L⁻¹ β-巯基乙醇], 于 37 °C、5% (体积分数) CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 分组与细胞处理 用 0.25% (体积分数) 胰蛋白酶消化 INS-1 细胞, 吹打混匀后接种于培养皿或培养板中, 待细胞贴壁后弃去原培养液, 干预处理: ① p,p'-DDE 处理组, 以 DMSO 为溶剂 (终体积分数 ≤ 0.1%), 分别给予含不同浓度 p,p'-DDE 的完全培养基处理 24 h; ② 对照组, 给予含等量 DMSO 的完全培养基培养 24 h。

1.3 检测指标与检测方法

1.3.1 CCK-8 法测定细胞活力 取对数生长期 INS-1 细胞, 以 2×10⁴ 个·孔⁻¹ 接种于 96 孔板, 每组设置 6 个复孔, 每孔分别加入 100 μL 含不同浓度 p,p'-DDE 的培养基 (0、3.125、6.25、12.5、25、50、75 μmol·L⁻¹) 培养 24 h, 待测前弃去旧培养基, 每孔分别加入 100 μL 完全培养基和 10 μL CCK-8 溶液, 37 °C 培养箱避光培养 1~4 h, 用酶标仪于 450 nm 处检测光密度 *D* 值。细胞存活率 = [(*D*_{实验组} - *D*_{空白培养基}) / (*D*_{对照组} - *D*_{空白培养基})] × 100%。

1.3.2 亚硫酸氢盐修饰测序法测定 H19 DMR 甲基化水平 取对数生长期 INS-1 细胞, 以 1×10⁶ 个·孔⁻¹ 接种于 6 孔板, 不同浓度 p,p'-DDE (0、12.5、25、50 μmol·L⁻¹) 处理 24 h, 根据 DNA 提取试剂盒操作步骤, 提取 INS-1 细胞的总 DNA, 参照 EZ DNA 甲基化试剂盒-Gold® 操作步骤, 将 DNA 样品进行亚硫酸氢盐修饰, 配制混合液, 混匀, 放入 PCR 仪器进行甲基化特异性引物 PCR 扩增目的片段, 上游引物 AGTGTGTAGGGATTAAGGGGAAATT, 下游引物 TCAATCTCAATTACAATCTATTTCACAAA, 反应条件: 95 °C, 10 min; 95 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 50 s, 共 40 个循环。将纯化的 PCR 产物克隆到专用载体, 挑出阳性克隆子送上海生工生物公司测序, 测序结果用 QUMA 2019 软件分析, 确定 H19 DMR 中 24 个 CpG 位点甲基化水平。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 IGF2 基因转录水平

细胞分组和处理同“1.3.2”, 后采用 Trizol 提取 INS-1 细胞的总 RNA 进行荧光定量 PCR 反应。IGF2 基因上游引物 TAACACCGGCTAGAGCCATCAAC, 下游引物 ACTCAGGCCAAGCGATAGAGACA。反应条件: 95 °C, 2 min; 95 °C, 15 s; 60 °C, 15~30 s, 40 个循环。

1.3.4 Western blotting 检测 IGF2 和 IGF1R 蛋白水平

细胞分组和处理同“1.3.2”, 后裂解细胞提取细胞蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶浓缩胶为 5% (体积分数), 分离胶为 12.5% (体积分数)。电泳条件: 浓缩胶 80 V、30 min, 分离胶 110 V、60 min。转膜条件: 350 mA、120 min。转印至聚偏二氟乙烯膜后, 5% (体积分数) 脱脂奶粉封闭 2 h, 4 °C 孵育兔抗 IGF2 (1:2000)、IGF1R (1:500) 或 β-actin (1:5000) 抗体过夜, 室温孵育山羊抗兔 2 h, ECL 发光液曝光, Photoshop 2019 软件分析条带的灰度值。

1.3.5 葡萄糖刺激胰岛素分泌 (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS) 实验测定 INS-1 细胞胰岛素分泌功能

取对数生长期 INS-1 细胞, 以 1×10⁵ 个·孔⁻¹ 接种于 24 孔板, 用不同浓度 p,p'-DDE (0、12.5、25、50 μmol·L⁻¹) 处理 24 h, 无糖 KRBH 缓冲液培养 30 min 后, 分别用含不同浓度葡萄糖 (5、25 mmol·L⁻¹) KRBH 缓冲液培养细胞 1 h。用胰岛素 ELISA 检测试剂盒测 KRBH 缓冲液中胰岛素水平, 同时提取每孔细胞总蛋白, 用 BCA 法测蛋白浓度进行校正: 胰岛素质量分数 (μg·g⁻¹) = 每孔胰岛素质量浓度 (μg·L⁻¹) / 每孔细胞总蛋白质量浓度 (g·L⁻¹)。

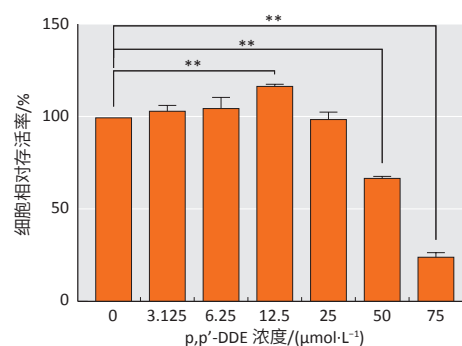
1.4 统计学分析

所有实验结果均表示为均数 ± 标准差, 并采用单因素方差分析方法分析组间差异, 检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 p,p'-DDE 对 INS-1 细胞活力的影响

如图 1 所示, 低剂量 p,p'-DDE (3.125、6.25 μmol·L⁻¹) 不影响 INS-1 细胞活力, 12.5 μmol·L⁻¹ p,p'-DDE 增加 INS-1 细胞活力, 高剂量 p,p'-DDE (50、75 μmol·L⁻¹) 抑制 INS-1 细胞活力, 细胞相对存活率分别下调为 67.3%、25.6%, 故本研究选择 50 μmol·L⁻¹ 为最高染毒浓度。



[注] **: 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

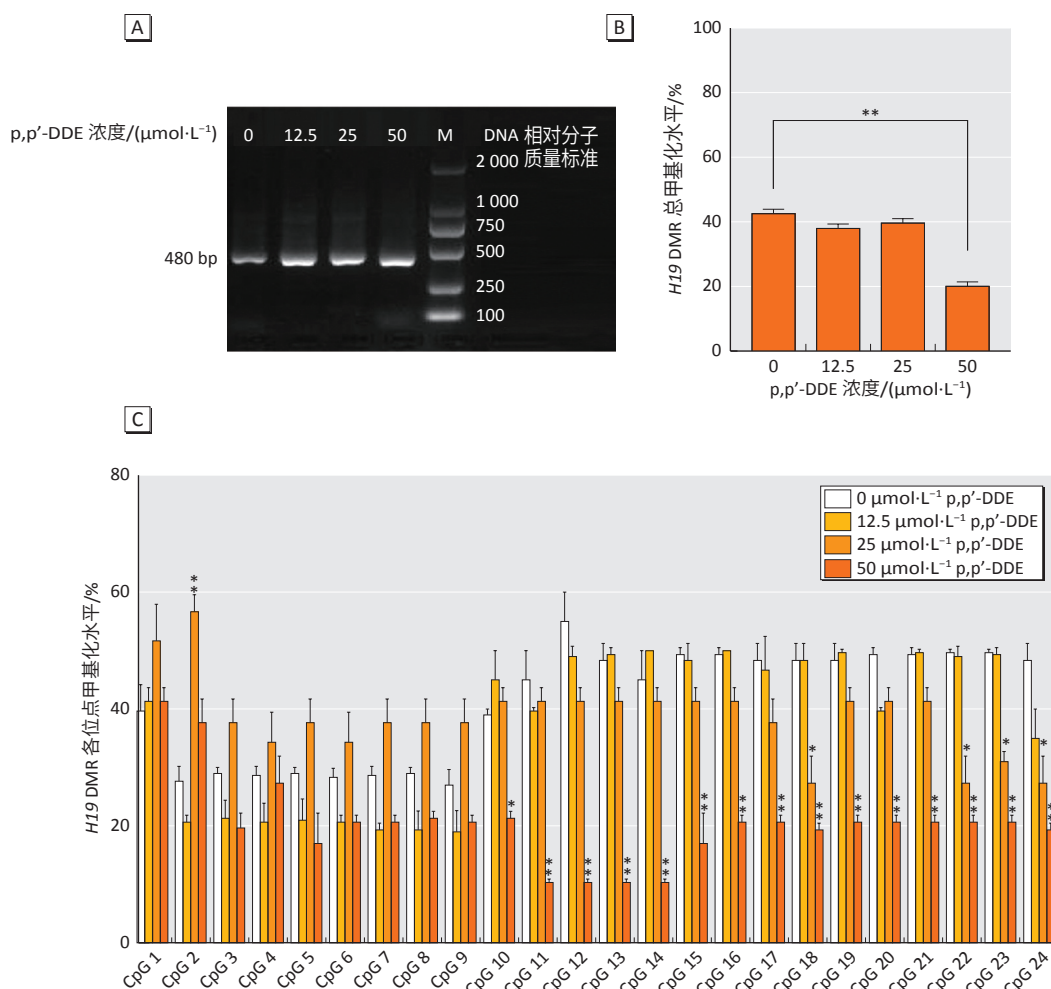
图 1 p,p'-DDE 对 INS-1 细胞活力的影响

Figure 1 Effect of p,p'-DDE on the viability of INS-1 cells

2.2 p,p'-DDE 对 INS-1 细胞 H19 DMR 甲基化水平的影响

亚硫酸氢盐修饰后的所有 DNA 样本经 PCR 扩增得大小为 480 bp 条带,与预期大小相符(图 2A)。0、12.5、25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 组 H19 DMR 甲基化水平分别为 42.9%、38.3%、40.0%、20.4%,与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照组相比,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 下调 H19 DMR 甲基化水平($P<0.01$,图 2B)。25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 可下调

H19 DMR CpG18、CpG22~CpG24 位点甲基化水平,分别下调为 27.0%、27.3%、31.0%、27.3%($P<0.05$,图 2C); 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 可下调 H19 DMR CpG10~CpG24 位点甲基化水平,分别下调为 21.4%、11.3%、10.4%、10.3%、10.4%、17.0%、20.6%、20.7%、17.0%、20.6%、20.6%、20.6%、20.7%、20.7%、17.3%($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图 2C);同时,p,p'-DDE 暴露对 H19 DMR CpG1~CpG9 位点的作用无统计学意义(图 2C)。



[注] A: H19 基因 DMR PCR 产物凝胶检测, B: H19 基因 DMR 甲基化测序结果分析, C: H19 DMR 甲基化位点统计学分析。M: DNA 相对分子质量标志物。与对照组相比, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

图 2 p,p'-DDE 对 INS-1 细胞中 H19 DMR 甲基化水平的影响

Figure 2 Effect of p,p'-DDE on H19 DMR methylation in INS-1 cells

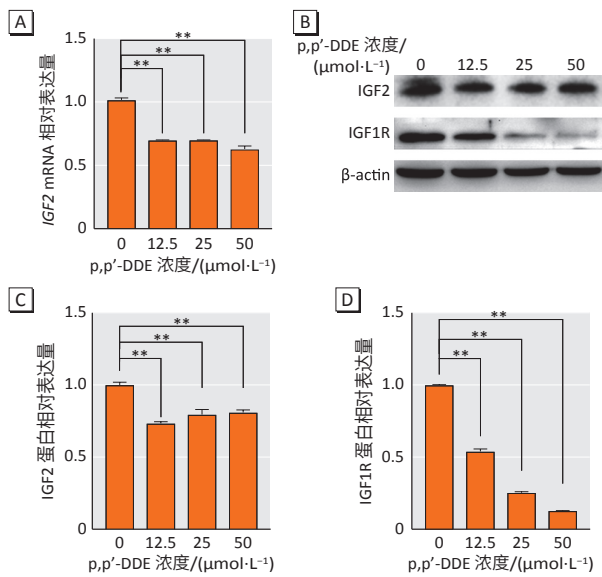
2.3 p,p'-DDE 对 INS-1 细胞 IGF2/IGF1R 信号通路表达的影响

12.5、25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 可下调 IGF2 转录水平,分别降低为对照的 67.8%、68.6%、62.5%($P<0.01$,图 3A)。在蛋白水平上,12.5、25、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 可下调 IGF2 和 IGF1R 蛋白水平,IGF2 蛋白水平分别降低为对照的 73.3%、79.5%、80.9%($P<0.01$,图 3B、3C),IGF1R 蛋白水平分别降低为对照的 54.8%、25.6%、12.9%

($P<0.01$,图 3B、3D)。

2.4 p,p'-DDE 对 INS-1 细胞胰岛素分泌的影响

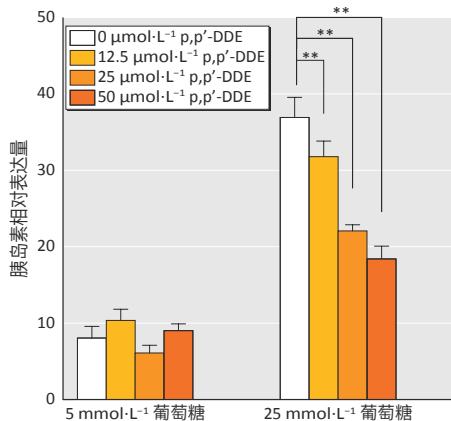
在低糖环境(5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖)下, p,p'-DDE 对 INS-1 细胞胰岛素分泌功能的改变无统计学意义($P>0.05$)。而在高糖环境(25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖)下,随着 p,p'-DDE 暴露浓度的增加,INS-1 细胞的胰岛素分泌水平逐渐降低,分别降低为对照组的 85.0%、58.6%、49.5%($P<0.01$)。见图 4。



[注]**: 与对照组相比, $P < 0.01$ 。A: IGF2 mRNA 表达; B: IGF2、IGF1R 蛋白条带; C: IGF2 蛋白相对表达量; D: IGF1R 蛋白相对表达量。

图3 p,p'-DDE 对 INS-1 细胞 IGF2/IGF1R 信号通路表达的影响

Figure 3 Effect of p,p'-DDE on the expression of IGF2/IGF1R signaling pathway in INS-1 cells



[注]**: 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

图4 p,p'-DDE 对 INS-1 细胞胰岛素分泌水平的影响

Figure 4 Effect of p,p'-DDE on insulin secretion of INS-1 cells

3 讨论

流行病学研究表明,有机氯农药与 T2DM 风险增加相关,其中 p,p'-DDE 的关联性最强, $OR(95\%CI) = 1.95(1.44 \sim 2.66)$ ^[4]。体外实验表明,长期低剂量暴露于 p,p'-DDT 可导致胰岛 β 细胞胰岛素分泌水平降低。在本研究中, p,p'-DDE 暴露可引起 INS-1 细胞中 *H19* DMR 低甲基化、印记基因 *IGF2* 表达下调、IGF2/IGF1R 信号通路抑制,最终导致胰岛细胞 GSIS 功能异常。

本实验选择 INS-1 细胞为研究对象,探讨 p,p'-DDE 对胰岛细胞胰岛素分泌的影响及相关分子机制。结果显示,低剂量 p,p'-DDE ($\leq 12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 增加胰

岛细胞活力,表现出低剂量兴奋效应,而在高剂量时 ($\geq 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 细胞的活力显著受抑制。Pavlikova 等^[10]发现 p,p'-DDE ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可下调胰岛细胞 NES2Y 存活率至 57%,同时细胞中一种参与糖酵解的蛋白(α 烯醇化酶)表达被抑制。Mangum 等^[11]发现,分别用不同浓度 p,p'-DDE 处理小鼠胚胎成纤维细胞 (3T3-L1) 24 h,只有 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 可轻微下调 3T3-L1 细胞活力,另外, p,p'-DDE 可诱导细胞内中性脂肪积累。Song 等^[12]发现 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 可导致支持细胞存活率下调至 70%,细胞中活性氧生成增加,线粒体膜电位降低,细胞色素 C 释放到胞质中,最终诱导线粒体细胞凋亡增加。所以本研究选择 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ p,p'-DDE 为后续实验的最高暴露剂量。

研究发现,全基因组和特定基因的异常甲基化均与糖尿病的发生密切相关^[13]。流行病学研究表明,血清 p,p'-DDE 水平与全基因组 DNA 甲基化水平呈负相关关系 ($\beta = -0.38, P = 0.01$)^[14]。L-甲硫氨酸经叶酸循环和甲硫氨酸循环合成 S-腺苷甲硫氨酸^[15]。Olsvik 等^[16]提出, p,p'-DDE 可能通过影响 L-甲硫氨酸的降解来干扰 DNA 甲基化水平。*IGF2* 是与胰岛 β 细胞发育和胰岛素分泌密切相关的基因, *IGF2* 的表达受四种 *IGF2/H19* DMRs 甲基化水平调控,分别为 *H19* DMR、*IGF2* DMR0、*IGF2* DMR1 和 *IGF2* DMR2。本课题组前期研究发现,母鼠孕期 p,p'-DDE 暴露可诱导子代胰岛细胞 *IGF2* DMR2、*H19* DMR 多个位点低甲基化,导致子代葡萄糖耐量异常、胰岛 β 细胞功能障碍^[17]。另外,其他环境内分泌干扰物暴露也可引起胰岛 β 细胞 DNA 甲基化异常。Mao 等^[18]研究发现,孕期和哺乳期 SD 大鼠双酚 A 暴露于可上调雄性子代胰岛细胞中 *IGF2* DMR2 甲基化水平,下调 *IGF2* 转录水平,导致子代胰岛 β 细胞功能障碍、葡萄糖耐量异常。结合本研究结果,印记基因 *IGF2* 和 *H19* 可能是环境内分泌干扰物导致 INS-1 细胞功能受损的重要靶点。

IGF2/IGF1R 信号通路在调控胰岛 β 细胞增殖和分泌功能中发挥重要作用。IGF2 可与其受体 IGF1R 结合,激活下游磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 通路,在葡萄糖摄取和抑制肝葡萄糖输出过程中发挥重要作用^[19-20]。胰岛素对糖代谢的调节作用需要激活 PI3K 下游靶点 AKT, AKT 磷酸化诱导葡萄糖转运蛋白从细胞质转运至质膜,继而增加葡萄糖向细胞内转运^[21]。有研究表明, RNA 干扰沉默胰岛细胞 *IGF2* 基因可下调胰岛细胞胰岛素分泌功能^[8]。另外,动物实验也表明,

小鼠 *IGF2* 基因敲除可导致胰岛细胞增殖抑制, 胰岛素分泌功能受损^[7]。Kulkarni 等^[22]发现, *IGF1R* 基因敲除可诱导小鼠糖耐量受损, 小鼠胰岛细胞胰岛素分泌功能缺陷。本研究发现 p,p'-DDE 暴露可导致 INS-1 细胞 *IGF2* mRNA、蛋白水平和 *IGF1R* 蛋白水平均下调。那么, p,p'-DDE 是否通过干扰 *IGF2* 表达继而影响胰岛细胞胰岛素分泌水平, 这有待进一步研究。

综上所述, p,p'-DDE 暴露干扰 *H19* DMR 甲基化水平, 下调 *IGF2* 表达, 抑制 *IGF2/IGF1R* 信号通路表达, 最终导致胰岛细胞胰岛素分泌水平的降低。

参考文献

- [1] 焦守海, 王静, 季虹, 等. 持久性有机污染物致糖尿病潜在病理机制[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(5): 456-458.
JIAO SH, WANG J, JI H, et al. Potential pathological mechanism of diabetes induced by persistent organic pollutants[J]. Chin J Prev Med, 2011, 45(5): 456-458.
- [2] SAEEDI P, PETERSOHN I, SALPEA P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the international diabetes federation diabetes atlas, 9th edition[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 157: 107843.
- [3] 陈蝶, 高明, 叶李嘉, 等. 孕期p,p'-DDE暴露对仔鼠胰岛细胞*IGF2/H19*基因印记和胰岛功能的影响及叶酸的干预作用[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(6): 564-570.
CHEN D, GAO M, YE LJ, et al. Effects of prenatal exposure to p,p'-DDE on *IGF2/H19* gene imprinting and islet function in rat offspring and the intervention effect of folic acid[J]. J Environ Occup Med, 2019, 36(6): 564-570.
- [4] EVANGELOU E, NTRITSOS G, CHONDROGIORGIS M, et al. Exposure to pesticides and diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. Environ Int, 2016, 91: 60-68.
- [5] MEEK EC, JONES DD, CROW JA, et al. Association of serum levels of p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) with type 2 diabetes in African American and Caucasian adult men from agricultural (Delta) and non-agricultural (non-Delta) regions of Mississippi[J]. J Toxicol Environ Health A, 2019, 82(6): 387-400.
- [6] LEE YM, HA CM, KIM SA, et al. Low-dose persistent organic pollutants impair insulin secretory function of pancreatic β -cells: human and in vitro evidence[J]. Diabetes, 2017, 66(10): 2669-2680.
- [7] MODI H, JACOVETTI C, TARUSSIO D, et al. Autocrine action of *IGF2* regulates adult β -cell mass and function[J]. Diabetes, 2015, 64(12): 4148-4157.
- [8] CORNU M, MODI H, KAWAMORI D, et al. Glucagon-like peptide-1 increases β -cell glucose competence and proliferation by translational induction of insulin-like growth factor-1 receptor expression[J]. J Biol Chem, 2010, 285(14): 10538-10545.
- [9] ULLRICH S, ABEL KB, LEHR S, et al. Effects of glucose, forskolin and tolbutamide on membrane potential and insulin secretion in the insulin-secreting cell line INS-1[J]. Pflugers Arch, 1996, 432(4): 630-636.
- [10] PAVLIKOVA N, SMETANA P, HALADA P, et al. Effect of prolonged exposure to sublethal concentrations of DDT and DDE on protein expression in human pancreatic beta cells[J]. Environ Res, 2015, 142: 257-263.
- [11] MANGUM LH, HOWELL GE, CHAMBERS JE. Exposure to p,p'-DDE enhances differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in a model of sub-optimal differentiation[J]. Toxicol Lett, 2015, 238(2): 65-71.
- [12] SONG Y, LIANG X, HU Y, et al. p,p'-DDE induces mitochondria-mediated apoptosis of cultured rat Sertoli cells[J]. Toxicology, 2008, 253(1/2/3): 53-61.
- [13] LING C, RÖNN T. Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes[J]. Cell Metab, 2019, 29(5): 1028-1044.
- [14] RUSIECKI JA, BACCARELLI A, BOLLATI V, et al. Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit[J]. Environ Health Perspect, 2008, 116(11): 1547-1552.
- [15] MENTCH SJ, LOCASALE JW. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity[J]. Ann N Y Acad Sci, 2016, 1363(1): 91-98.
- [16] OLSVIK PA, SØFTELAND L. Metabolic effects of p,p'-DDE on Atlantic salmon hepatocytes[J]. J Appl Toxicol, 2018, 38(4): 489-503.
- [17] SONG Y, YANG L. Transgenerational pancreatic impairment with *igf2/H19* epigenetic alteration induced by p,p'-DDE exposure in early life[J]. Toxicol Lett, 2017, 280: 222-231.
- [18] MAO Z, XIA W, CHANG H, et al. Paternal BPA exposure in early life alters *igf2* epigenetic status in sperm and induces pancreatic impairment in rat offspring[J]. Toxicol Lett, 2015, 238(3): 30-38.
- [19] STANFORD KI, GOODYEAR LJ. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle[J]. Adv Physiol Educ, 2014, 38(4): 308-314.
- [20] ZHANG Z, LIU H, LIU J. Akt activation: a potential strategy to ameliorate insulin resistance[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 156: 107092.
- [21] JANG JH, PARK JE, HAN JS. Scopoletin increases glucose uptake through activation of PI3K and AMPK signaling pathway and improves insulin sensitivity in 3T3-L1 cells[J]. Nutr Res, 2020, 74: 52-61.
- [22] KULKARNI RN, HOLZENBERGER M, SHIH DQ, et al. β -cell-specific deletion of the *Igf1* receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter β -cell mass[J]. Nat Genet, 2002, 31(1): 111-115.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 陈姣, 汪源)