

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

陈蝶, 高明, 叶李嘉, 谭玉凤, 姚春冀, 周程, 陈日萍, 吴南翔

浙江省医学科学院卫生学研究所, 浙江 杭州 310013

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19056

摘要:

[背景] 糖尿病是在全球都具有高发病率的一种慢性疾病, 而我国确诊的糖尿病人数已经超过 1 亿。多项研究表明, 2, 2-双-(对氯苯基)-1, 1-二氯乙烯 (p, p'-DDE) 暴露可以干扰葡萄糖代谢以及胰岛素分泌过程, 与 II 型糖尿病发病率升高之间具有相关性。另外, 孕期 p, p'-DDE 暴露可以引起子代糖耐量受损, 致子代糖尿病敏感性升高。

[目的] 研究 p, p'-DDE 孕期暴露对子代 SD 大鼠胰岛细胞胰岛素样生长因子-2 (IGF2) /H19 基因印记和胰岛功能的影响, 以及甲基供体叶酸在此过程中的干预作用。

[方法] 采用逆行灌注法提取原代胰岛细胞并进行纯度、存活率与胰岛素分泌功能鉴定。将 8~10 周性成熟 SD 大鼠合笼交配, 孕鼠随机分为对照组、p, p'-DDE 染毒组和叶酸干预组, 每组 8 只。p, p'-DDE 染毒组和叶酸干预组于孕第 8~15 天每天按 5 mL/kg (以体重计) 连续灌胃给予 20 mg/mL p, p'-DDE; 对照组给予等容积的玉米油; 叶酸干预组整个孕期进食添加 3.5 mg/kg 叶酸的饲料。孕鼠自由分娩, 每窝保留雌雄仔鼠各 4 只。各组仔鼠 21 d 断乳后均摄食普通饲料。称取出生后 1 周、3 周及 8 周仔鼠体重。提取出生后 8 周仔鼠胰岛细胞 DNA 和 RNA, 分别用亚硫酸氢盐法和实时荧光定量 PCR 法检测胰岛细胞 IGF2/H19 基因印记调控区域甲基化水平以及 IGF2 和 H19 mRNA 表达水平。出生后 8 周的仔鼠进行葡萄糖耐量试验, 测定空腹及灌胃后 15、30、60、120 min 尾静脉血中的血糖水平。同时, 灌胃前及灌胃后 2 h 进行眼眶采血, ELISA 测定血清中的胰岛素水平。

[结果] 提取的原代胰岛细胞经鉴定, 纯度为 (90±5)%, 存活率大于 90%, 具有胰岛素分泌功能。p, p'-DDE 染毒组仔鼠 IGF2/H19 基因印记调控区甲基化水平 [(51.5±3.8)%] 低于对照组 [(55.9±3.3)%] (P=0.031), 与叶酸干预组 [(52.8±1.9)%] 相比差异无统计学意义。p, p'-DDE 染毒组仔鼠 IGF2 mRNA 相对表达水平 [(265.4±70.6)%] 高于对照组 (100%) (P=0.002) 和叶酸干预组 [(101.8±65.9)%] (P=0.002); 各组 H19 mRNA 相对表达水平差异无统计学意义。3 组仔鼠在出生后 1 周、3 周与 8 周体重差异均无统计学意义。p, p'-DDE 染毒组仔鼠灌胃后 15 min 血糖水平 [(10.89±1.17) mmol/L] 高于对照组 [(9.29±1.18) mmol/L] (P=0.026) 和叶酸干预组 [(9.25±0.95) mmol/L] (P=0.022)。3 组仔鼠空腹及餐后 2 h 血清胰岛素水平差异均无统计学意义。

[结论] p, p'-DDE 孕期暴露可降低子代 SD 大鼠胰岛细胞 IGF2/H19 的印记调控区甲基化水平, 上调 IGF2 mRNA 转录水平, 诱导子代胰岛细胞功能受损。叶酸在该过程中具有一定的干预作用。

关键词: 2, 2-双(对氯苯基)-1, 1-二氯乙烯 (p, p'-DDE); 孕期暴露; 基因印记; 胰岛素样生长因子-2; 胰岛功能; 叶酸

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 CHEN Die, GAO Ming, YE Li-jia, TAN Yu-feng, YAO Chun-ji, ZHOU Cheng, CHEN Ri-ping, WU Nan-xiang (Institute of Hygiene, Zhejiang Academy of Medical Science, Hangzhou, Zhejiang 310013, China)

Abstract:

[Background] Diabetes mellitus is a chronic disease with high incidence all over the world and the number of diagnosed diabetes in China has exceeded 100 million. Several studies have shown that p, p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (p, p'-DDE) exposure can interfere with glucose metabolism and insulin secretion, and has a correlation with the increased incidence of type 2

基金项目

浙江省医药卫生科技计划项目 (2015114050); 浙江省科技计划项目 (2016C33203)

作者简介

陈蝶 (1993—), 女, 硕士生; E-mail: chendie2017@163.com

通信作者

高明, E-mail: gm19851105@126.com

伦理审批

已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-01-30

录用日期 2019-04-24

文章编号 2095-9982(2019)06-0564-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

► 引用

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.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19056

Funding

This study was funded.

Correspondence to

GAO Ming, E-mail: gm19851105@126.com

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2019-01-30

Accepted

2019-04-24

► To cite

CHEN Die, GAO Ming, YE Li-jia, 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]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(6): 564-570.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19056

diabetes mellitus. In addition, exposure to p, p'-DDE during pregnancy can cause impaired glucose tolerance and induce diabetes in offspring.

[Objective] This study aims to investigate the effects of prenatal exposure to p, p'-DDE on insulin like growth factor 2 (*IGF2*)/*H19* gene imprinting and islet function in the offspring of SD rats, and to study whether folic acid as a methyl donor has an intervention effect on the process.

[Methods] The primary islet cells were isolated by retrograde perfusion method, and were tested for purity, survival rate, and insulin secretion function. Sexually mature SD rats at 8-10 weeks old were caged and mated, and pregnant rats were randomly divided into three groups: control group, p, p'-DDE group, and folic acid group, with eight rats in each group. On gestational day 8-15, the rats in the p, p'-DDE group and the folic acid group were given p, p'-DDE (20 mg/mL) at 5 mL/kg (body weight) by gavage; the rats in the control group were given the same volume of corn oil; the rats in the folic acid group were fed a diet supplemented with folic acid (3.5 mg/kg). At birth, pups were culled to four males and four females in each litter and were fed an ordinary diet after weaning. Weights of the pups were weighed in the first, third, and eighth weeks after birth. Eight weeks after birth, DNA and RNA were extracted to detect the methylation level of *IGF2/H19* imprinting region by bisulfite genomic sequencing and the expression levels of *IGF2* and *H19* mRNA by real-time quantitative PCR. The pups at 8 weeks old were subject to glucose tolerance test. The blood glucose levels in the caudal vein were measured before and 15, 30, 60, and 120 min after intragastric administration. At the same time, the serum insulin levels in the blood of orbit were determined by ELISA before and 2 h after intragastric administration.

[Results] The purity was (90±5)%, the survival rate was more than 90%, and the primary islet cells secreted insulin. The methylation level of *IGF2/H19* imprinting region in the p, p'-DDE group offspring [(51.5±3.8)%] was lower than that in the control group offspring [(55.9±3.3)%] ($P=0.031$), but had no significant difference compared with the folic acid group offspring [(52.8±1.9)%]. The expression level of *IGF2* mRNA in the p, p'-DDE group offspring [(265.4±70.6)%] was higher than those in the control group offspring (100%) ($P=0.002$) and the folic acid group offspring [(101.8±65.9)%] ($P=0.002$). No significant difference was found in *H19* mRNA expression level among the three groups. There was also no significant difference in body weight in the first, third, and eighth weeks among the three groups. The blood glucose level at 15 min after intragastric administration in the p, p'-DDE group offspring [(10.89±1.17) mmol/L] was higher than those in the control group offspring [(9.29±1.18) mmol/L] ($P=0.026$) and the folic acid group offspring [(9.25±0.95) mmol/L] ($P=0.022$). There was no significant difference in serum insulin level before and 2 h after intragastric administration among the three groups.

[Conclusion] Prenatal exposure to p, p'-DDE could reduce the methylation level of *IGF2/H19* imprinting region and up-regulate the transcription of *IGF2* mRNA, and then impair islet function in the offspring of SD rats. Folic acid plays an intervention role in this process.

Keywords: p, p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (p, p'-DDE); prenatal exposure; gene imprinting; insulin like growth factor 2; islet function; folic acid

2, 2-双(对氯苯基)-1, 1-二氯乙烯 [p, p'-dichlorodiphenyldichloroethylene, p, p'-DDE] 是 20 世纪广泛使用的有机氯农药 2, 2-双(4-氯苯基)-1, 1, 1-三氯乙烷 (dichlorodiphenyltrichloroethane, DDT) 在自然界中的主要代谢产物, 也是 DDT 在环境与生物体中长期残留的标志物^[1], 其难挥发、难降解的特性使它可以随着环境介质进行远距离迁移, 并能通过食物链不断富集, 对生物体造成毒性。据世界卫生组织调查, 中国母乳中总 DDT 水平高于 1000 ng/kg (以脂肪计), 与印度、菲律宾、苏丹等国家持平, 高于美国、澳大利亚等国家^[2], 表明我国孕产妇的 p, p'-DDE 暴露水平较高。

糖尿病是全球高发病率的一种慢性疾病, 我国目前确诊的糖尿病人数已经超过 1 亿^[3], 由此带来巨额的医疗费用支出和健康损害。Turky 等^[4] 的队列研究结果表明 p, p'-DDE 与五大湖渔民糖化血红蛋白指标的改变具有正相关性, 是 II 型糖尿病的危险因素; Howell 等^[5] 对小鼠进行的动物实验表明成年小鼠连续 5 d 暴露于 2 mg/kg p, p'-DDE, 会导致空腹血糖升

高。Barker 最先提出“胎儿起源假说”, 认为胚胎发育早期不良生长环境可能会增加成年期患糖尿病、高血压、心血管疾病和其他疾病的风险^[6]。之后 Song 等^[7] 研究表明 p, p'-DDE (100 mg/kg) 孕期 8~15 d 暴露可致多代仔鼠糖耐量受损。胚胎发育早期是机体基因印记建立的敏感期和关键期^[8]。基因印记是一种不遵循孟德尔遗传规律的亲本等位基因差异性表达的现象^[9]。印记异常或错误不仅会导致胚胎及婴儿期发育异常、先天性畸形等, 也可能影响个体发育进程中印记基因的表达而出现远期效应^[10]。印记基因可分为母系印记基因和父系印记基因, 母系印记基因胰岛素样生长因子-2 (insulin like growth factor 2, *IGF2*) 及其交互基因 *H19* 是最早发现的内源性印记基因, 可通过对 *H19* 启动子附近的印记控制区域进行 DNA 甲基化修饰来调节等位基因的不对称表达^[11]。*IGF2* 基因表达产物是一种多功能细胞增殖调控因子, 在胚胎发育、细胞增殖分化、机体脂肪和糖代谢中具有重要的促进作用。

叶酸, 即维生素 B₉, 介导生物体内一碳单位的转

移,参与DNA和RNA的合成,起到甲基供体的作用,从而维持基因甲基化状态,对子代生长发育产生影响^[12]。

目前,关于p, p'-DDE与II型糖尿病相关性的研究较多,但大多探讨母体暴露于p, p'-DDE后子代的胰岛功能受损状况,其表观遗传机制及叶酸作为保护因素的研究较为缺乏。因此,本研究探讨母鼠孕早期暴露于p, p'-DDE研究仔鼠胰岛细胞IGF2/H19基因印记的改变及其对仔鼠血糖、胰岛分泌功能的影响,同时探讨叶酸在该过程中的干预作用。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

p, p'-DDE、叶酸(Sigma,美国),胶原酶P(Roche,瑞士),Ficoll400分离液(GE,美国),AIN-93G饲料(浙江省医学科学院,中国),钙黄绿素-乙酰甲氧基甲酯/碘化丙啶(Calcein-AM/PI)活细胞/死细胞双染试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,中国),胰岛素ELISA试剂盒(ALPCO,美国),RNA提取试剂盒、DNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa,日本)。

激光扫描共聚焦显微镜(Zeiss,德国),Synergy2酶标仪(Biotek,美国),CO₂培养箱(Thermo,美国),血糖仪(鱼跃医疗设备有限公司,中国),低温高速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司,中国),高通量测序仪(Illumina,美国),实时荧光定量PCR仪(Thermo,美国)。

1.2 逆行灌注法提取原代胰岛细胞及鉴定

参考研究^[13]的提取方法,性成熟SD大鼠经麻醉后,打开胸腔,采集心脏血液。打开腹腔,经胆总管内插管逆行灌注预冷的1mg/mL胶原酶P溶液5mL,迅速摘取整个胰腺,移入预置3mL胶原酶P溶液的消化瓶中。38℃水浴中消化10min,震荡后加入4℃小牛血清1mL与4℃Hank's液30mL终止消化。用600μm不锈钢丝网过滤,细胞悬液于50mL离心管573×g 4℃离心2min,弃去上清液,沉淀物加入4℃Hank's液洗涤,重悬后转移至15mL离心管内,573×g 4℃离心2min,弃去上清液。沉淀物加25%Ficoll 4mL混匀,其上依次分别加入23%、20%、11%Ficoll溶液和Hank's液各2mL,573×g 4℃离心10min,吸出23%~20%及20%~11%界面的悬浮细胞团,用Hank's液洗涤2次。将沉淀物转移至25mm培养皿中,放入37℃、5%CO₂培养箱中进行原代培养。培养24h后,转皿去除成纤维细胞,继

续培养以用于后续实验。

取200L二硫腙(dithizone,DTZ)染色液与培养皿中的胰岛细胞混合,置于室温10min后,相差显微镜下镜检。存活率测定采用Calcein-AM/PI染色法,在有胰岛细胞的培养皿中加入1μL Calcein-AM和3μL PI孵育15min,在激光扫描共聚焦显微镜下可同时见到活细胞的绿色荧光和死细胞的红色荧光。

胰岛细胞培养3d后,参考研究^[14]的胰岛素释放实验方法并增加葡萄糖浓度与时间点,更换培养液为含0、500、2000、4500mg/L葡萄糖的RPMI-1640培养液(该浓度范围为0~24.9mmol/L,包括正常人体血糖浓度3.8~11.1mmol/L),1、2、4、8h后分别收集200μL培养液,采用ELISA测定培养液上清中胰岛素水平。

1.3 动物分组与处理

性成熟雌雄SD大鼠各30只,8~10周,体重220g以上,购自浙江省实验动物中心,实验动物许可证号为SYXK(浙)2014-001。实验前大鼠自由进食AIN-93G饲料(不含植物雌激素成分的配方饲料),实验室温度20~26℃,湿度(55±15)%,维持光照和黑暗各12h的昼夜节律。在该环境适应1周后,于21:00将SD大鼠按1:1雌雄同笼交配,第2天早晨查到阴栓即为交配成功,为孕0d,保证交配成功的大鼠数能满足实验需要。将孕鼠随机分为对照组、p, p'-DDE染毒组和叶酸干预组。参考Li等^[15]的研究,在整个孕期,给予叶酸干预组3.5mg/kg(以体重计)叶酸的饲料,其余组别给予不含叶酸的饲料。参考王禹等^[16]的研究,孕第8天时p, p'-DDE染毒组及叶酸干预组孕鼠按5mL/kg(以体重计)的剂量灌胃给予20mg/mL p, p'-DDE,对照组孕鼠给予5mL/kg(以体重计)等容积玉米油,1次/d,连续灌胃至孕第15天。孕鼠自由分娩,分娩第4天保留雌雄仔鼠各4只,某一性别不足时则用另一性别补齐,保证每窝总数8只。各组仔鼠21d断乳后均摄食普通饲料至实验结束。称取出生后1周、3周及8周仔鼠体重并记录。

1.4 亚硫酸氢盐测序法测定IGF2/H19基因印记调控区甲基化水平

根据DNA提取试剂盒的操作步骤,提取出生后8周仔鼠原代胰岛细胞的总DNA。参考文献^[17]的方法,将DNA样品经亚硫酸氢钠处理后,进行甲基化特异性引物PCR扩增目的片段。PCR产物经纯化质控后,使用高通量测序仪测序,应用片段末端测序方法对插入片段进行测序分析,确定H19上游4kb范围内的印记调控区域甲基化水平。

1.5 实时荧光定量PCR测定胰岛细胞IGF2和H19 mRNA转录水平

柱式法分离提取胰岛细胞总RNA，逆转录后进行实时荧光定量PCR反应。IGF2：正向引物，5'-CGCTTCAGTTTGTCTGTTCCGG-3'；反向引物，5'-AACTTGCCACGGGGTATCT-3'。H19：正向引物，5'-AAGACATGACATGGTCCGGTGTGA-3'；反向引物，5'-AGACATGAGCTGGGTAGCACCATT-3'。β-actin：正向引物，5'-GGAGATTACTGCCTGGCTCCTA-3'；反向引物，5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'。

95°C 30s 预变性，95°C 30s，60°C 30s (40个循环) 进行PCR扩增反应，再作融解曲线检查产物特异性。每个样本设置3个复孔，最后取其平均Ct值，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法来解析基因mRNA的表达， $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}) - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_0$ 。

1.6 葡萄糖耐量试验及血清胰岛素水平检测

出生后8周的雌、雄仔鼠过夜禁食。用20%的葡萄糖溶液按10mL/kg (以体重计) 的剂量进行灌胃，各组仔鼠测定灌胃前及灌胃后15、30、60、120 min尾静脉血血糖值，并计算血糖曲线下面积 (area under curve, AUC)。同时用眼眶后静脉丛采血法采集灌胃前及灌胃后2h的眼眶血，1807×g 离心10 min 收集血清，采用ELISA法测定胰岛素水平。

1.7 统计学分析

各数据均为计量资料，以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。用SPSS 22.0 统计软件对数据进行单因素方差分析。方差齐时，两两比较采用Bonferroni校正；方差不齐时，两两比较采用Tamhane检验。统计检验为双侧。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

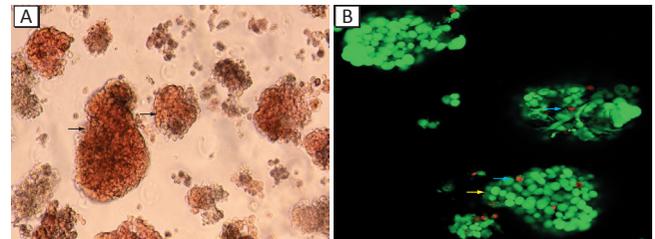
2.1 胰岛细胞鉴定结果

如图1A所示，胰岛细胞经DTZ染色后，在相差显微镜下呈猩红色，细胞纯度约为(90±5)%。如图1B所示，胰岛细胞经Calcein-AM/PI染色后，在共聚焦显微镜下活细胞呈绿色荧光，死细胞呈红色荧光，细胞存活率大于90%。如图2所示，胰岛细胞的胰岛素分泌水平呈现一定的时间累积效应和葡萄糖刺激效应。

2.2 胰岛细胞IGF2/H19印记调控区甲基化水平

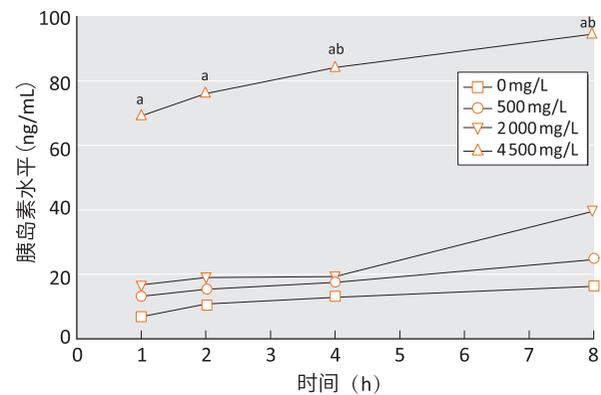
H19上游4 kb范围内总CpG位点135个，亚硫酸氢盐测序法扩增测序覆盖位点115个，覆盖率为85.2%。对照组、p, p'-DDE染毒组与叶酸干预组印记调

控区甲基化水平分别为(55.9±3.3)%、(51.5±3.8)%、(52.8±1.9)%。方差分析结果显示3组间印记调控区甲基化水平差异有统计学意义($P=0.029$)。经多重比较，p, p'-DDE染毒组印记调控区甲基化率低于对照组($P=0.031$)，其余组间差异无统计学意义。



[注] 图1A中，黑色箭头所指为胰岛细胞团。图1B中，黄色箭头所指为胰岛活细胞，蓝色箭头所指为胰岛死细胞。

图1 胰岛细胞DTZ染色(A, ×100)与AM/PI染色(B, ×400)结果

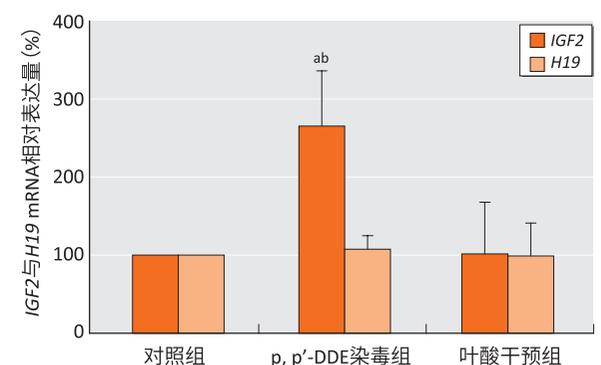


[注] a：同一时间点，各葡萄糖浓度组与0mg/L葡萄糖培养液组中胰岛素分泌水平相比， $P<0.05$ ；b：同一葡萄糖浓度下，各时间点与1h时间点胰岛素分泌水平相比， $P<0.05$ 。

图2 不同葡萄糖质量浓度下原代培养胰岛细胞胰岛素分泌水平

2.3 胰岛细胞IGF2和H19 mRNA转录水平

如图3所示，p, p'-DDE染毒组仔鼠的IGF2 mRNA表达水平为(265.4±70.6)%，经多重比较，该水平高于对照组仔鼠(100%) ($P=0.002$) 和叶酸干预组仔鼠 [(101.8±65.9)%] ($P=0.002$)，差异有统计学意义。各组H19 mRNA表达水平差异无统计学意义。



[注] a：与对照组相比， $P<0.01$ ；b：与叶酸干预组相比， $P<0.01$ 。

图3 仔鼠IGF2及H19 mRNA相对表达水平

2.4 仔鼠体重变化

如表1所示,与对照组相比, p, p'-DDE 染毒组、叶酸干预组仔鼠出生后1周、出生后3周和出生后8周体重差异无统计学意义。

表1 仔鼠体重变化 (n=8, g, $\bar{x}\pm s$)

组别	出生后1周	出生后3周	出生后8周
对照组	17.02±1.49	46.62±3.05	230.51±41.69
p, p'-DDE 染毒组	15.21±1.74	52.61±3.91	219.52±37.72
叶酸干预组	17.54±2.51	50.78±8.07	239.08±48.22
F	3.120	3.526	0.420
P	0.065	0.104	0.620

2.5 仔鼠尾静脉血糖变化

如表2所示,各组仔鼠灌胃后0 min 血糖值差异无统计学意义。在灌胃后15 min, p, p'-DDE 染毒组仔鼠的血糖水平高于对照组 (P=0.026) 和叶酸干预组 (P=0.022), 对照组与叶酸干预组之间差异无统计学意义。p, p'-DDE 染毒组仔鼠在灌胃后30、60、120 min 的血糖水平及血糖AUC与对照组和叶酸干预组相比均差异无统计学意义。餐后胰岛素分泌规律呈先高后低的峰值曲线,餐后15~30 min 达到峰值,但并未超出正常血糖范围 (3.8~11.1 mmol/L), 之后逐渐呈下降趋势。灌胃后2h的血糖值与空腹血糖值较为接近。

表2 仔鼠血糖水平和血糖AUC (n=8, $\bar{x}\pm s$)

组别	灌胃后血糖水平 (mmol/L)					血糖AUC (mmol·h/L)
	0min	15min	30min	60min	120min	
对照组	6.04±0.53	9.29±1.18	9.46±0.88	9.03±0.88	6.61±0.97	19.62±1.92
p, p'-DDE 染毒组	5.60±0.32	10.89±1.17 ^{ab}	10.11±0.89	8.54±0.58	6.46±0.68	19.32±0.75
叶酸干预组	5.85±0.40	9.25±0.95	9.70±1.01	8.93±1.70	6.43±0.87	19.44±2.24
F	2.131	5.717	0.994	0.406	0.110	0.059
P	0.144	0.010	0.387	0.671	0.897	0.943

[注] a: 与对照组相比, P<0.05; b: 与叶酸干预组相比, P<0.05。

2.6 仔鼠血清胰岛素水平

如表3所示,3组仔鼠空腹及餐后2h血清胰岛素水平均差异无统计学意义。

表3 仔鼠空腹及餐后2h血清胰岛素水平 (n=8, ng/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	空腹	餐后2h
对照组	0.076±0.050	0.117±0.049
p, p'-DDE 染毒组	0.101±0.079	0.106±0.104
叶酸干预组	0.078±0.045	0.102±0.075
F	0.409	0.249
P	0.670	0.782

3 讨论

流行病学与动物实验均表明 p, p'-DDE 孕期暴露与子代II型糖尿病发病率之间具有相关性。Debost-Legrand等^[18]的队列研究结果表明,产前暴露于 p, p'-DDE 会对新生儿脂联素和胰岛素水平产生影响,长期则影响葡萄糖代谢。王禹等^[16]的动物实验结果也表明大鼠 p, p'-DDE 孕期暴露会致子代糖耐量受损。但目前尚缺乏关于其具体机制及预防措施的研究。

You等的研究中宫内暴露的仔鼠体内 p, p'-DDE 水平^[19]与高污染区(如墨西哥)人体血清中的 p, p'-DDE 绝对值水平^[20]较为接近,是非常敏感的暴露剂量,已

被证明可致SD大鼠雄性子代生殖毒性^[9]。本研究设计的暴露剂量与其一致,该暴露剂量可较好地进行子代效应及机制研究。

胚胎发育期是个体基因印记形成的敏感阶段, IGF2/H19是最早发现也是目前研究最多的一对等位印记基因。H19位于IGF2的下游,编码一种调节细胞生长的非编码RNA,两者的印记作用均受到H19上游4 kb区域调控^[21]。Tian等^[22]认为IGF2印记状态异常与H19上游印记调控区的甲基化水平降低有关,同时,基因印记的状态会影响IGF2的表达,该过程主要发生在胚胎期印记的重建过程,印记丢失可导致IGF2呈双等位基因表达,其转录表达量上调^[23]。另外, Ozaki等^[24]认为IGF2过度表达会导致IGF2印记丢失,从另一个角度表明这三者之间可能存在关系,这些与本研究的实验结果均相符。由此推测,孕期暴露于 p, p'-DDE 可能影响子代发育过程中IGF2基因的甲基化修饰,导致印记异常甚至丢失, IGF2 转录表达上调。

本研究选择Li等^[15]研究中的叶酸补充组剂量作为本实验中叶酸干预组的剂量,发现叶酸可逆转 p, p'-DDE 暴露导致的印记调控区甲基化水平降低,下调IGF2的转录。叶酸可以介导生物体呼吸链

一碳单位的转移,作为S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)的前体促进该物质合成, SAM在DNA甲基化的过程中起到甲基供体的作用,从而维持基因甲基化状态,一定程度上逆转了印记缺失状态^[12]。DNA甲基化转移酶可以催化SAM转化为5-甲基胞嘧啶和S-腺苷同型半胱氨酸,5-甲基胞嘧啶是维持DNA甲基化必不可少的物质, Liu等^[25]发现叶酸可以提高DNA甲基化转移酶活性,进一步佐证了叶酸逆转印记丢失的作用。但Tserga等^[26]的队列研究结果表明,胎盘中异常的*H19*甲基化和婴儿脐血中*IGF2*单等位基因表达的偏离与妊娠期间补充叶酸无关,因此他们认为孕期叶酸补充与*IGF2*甲基化之间的关系还需进行大规模的后续研究。

Casellas等^[27]研究表明*IGF2*过表达会引起胰岛细胞去分化和“内质网压力”,抑制胰岛素相应受体的活性,提高胰岛细胞敏感性,导致胰岛细胞损伤。在本研究中,p,p'-DDE染毒组仔鼠在灌胃后15min血糖水平高于对照组和叶酸组。各组空腹和餐后2h血清胰岛素水平差异无统计学意义,该结果与Tang-Péronard等^[28]的人群流行病学研究结果一致。这可能是因为胰岛素释放本身是一个多因素、多阶段的调节过程,*IGF2*的过表达并没有显著影响胰岛素基因的翻译,以及后续运输、剪切和释放过程。

本研究提示孕期暴露于p,p'-DDE可下调子代胰岛细胞*IGF2/H19*印记调控区的甲基化水平,引起*IGF2*过表达,对胰岛素分泌功能产生影响。印记基因的表达调控是一个受到差异甲基化区、启动子、增强子等多个元件协同控制的复杂过程,今后的研究可围绕不同元件的具体控制机制及其在印记丢失中所发挥的作用展开,也可针对下游的胰岛功能受损进行深入的分分子机制研究。同时,本研究发现叶酸作为一种重要的甲基供体可以干预该过程,有力地佐证了叶酸干预印记形成的作用。

参考文献

- [1] DEWAN P, JAIN V, GUPTA P, et al. Organochlorine pesticide residues in maternal blood, cord blood, placenta, and breastmilk and their relation to birth size [J]. *Chemosphere*, 2013, 90 (5) : 1704-1710.
- [2] VAN DEN BERG M, KYPKE K, KOTZ A, et al. WHO/UNEP global surveys of PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs in human milk and benefit-risk evaluation of breastfeeding [J]. *Arch Toxicol*, 2017, 91 (1) : 83-96.
- [3] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas - 8th edition [EB/OL]. [2019-01-16]. <http://www.diabetesatlas.org>.
- [4] TURK M, FANTUZZI G, PERSKY V, et al. Persistent organic pollutants and biomarkers of diabetes risk in a cohort of Great Lakes sport caught fish consumers [J]. *Environ Res*, 2015, 140 : 335-344.
- [5] HOWELL III G E, MEEK E, KILIC J, et al. Exposure to p, p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) induces fasting hyperglycemia without insulin resistance in male C57BL/6H mice [J]. *Toxicology*, 2014, 320 : 6-14.
- [6] CALKINS K, DEVASKAR S U. Fetal origins of adult disease [J]. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2011, 41 (6) : 158-176.
- [7] 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.
- [8] RANCOURT R C, HARRIS H R, BARAULT L, et al. The prevalence of loss of imprinting of *H19* and *IGF2* at birth [J]. *FASEB J*, 2013, 27 (8) : 3335-3343.
- [9] 宋杨, 高明, 王禹, 等. p, p'-DDE致大鼠跨代雄性生殖毒性效应及*Igf2* DMR2区域甲基化的可能机制 [J]. *环境与职业医学*, 2017, 34 (2) : 106-111.
- [10] 刘峰, 彭宇环, 汤佳珍, 等. *IGF2*基因印记丢失对胚胎干细胞向胰岛样细胞诱导分化的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21 (9) : 1362-1367.
- [11] 朱婵, 徐勇飞, 渠利利. *IGF2*的生物学特性及其与疾病关系的研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31 (9) : 966-969.
- [12] ZHENG M, ZOU C, LI M, et al. Folic acid reduces tau phosphorylation by regulating PP2A methylation in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (4) : 861.
- [13] SAGHEB M M, AZARPIRA N, MOKHTARY M. The effect of ghrelin on Kiss-1 and KissR gene transcription and insulin secretion in rat islets of Langerhans and CRI-D2 cell line [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20 (1) : 36-40.
- [14] 张莉, 吕宗科. 大鼠胰岛细胞原代培养方法比较研究 [J]. *西北国防医学杂志*, 2010, 31 (6) : 436-438.
- [15] LI W, LI Z, LI S, et al. Periconceptional folic acid supplementation benefit to development of early sensory-motor function through increase DNA methylation in rat offspring [J].

- Nutrients, 2018, 10 (3) : 292.
- [16] 王禹, 宋杨, 高明, 等. *p*, *p'*-DDE 宫内暴露致子代SD大鼠糖耐量受损 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34 (1) : 71-75.
- [17] KUCHARSKI R, FORET S, MALESZKA R. EGFR gene methylation is not involved in royalactin controlled phenotypic polymorphism in honey bees [J]. Sci Rep, 2015, 5 : 14070.
- [18] DEBOST-LEGRAND A, WAREMBOURG C, MASSART C, et al. Prenatal exposure to persistent organic pollutants and organophosphate pesticides, and markers of glucose metabolism at birth [J]. Environ Res, 2016, 146 : 207-217.
- [19] LI Y, CASANOVA M, ARCHIBEQUE-ENGLE S, et al. Impaired male sexual development in perinatal Sprague-Dawley and long-Evans hooded rats exposed *in utero* and lactationally to *p*, *p'*-DDE [J]. Toxicol Sci, 1998, 45 (2) : 162-173.
- [20] LÓPEZ-CARRILLO L, TORRES-ARREOLA L, TORRES-SÁNCHEZ L, et al. Is DDT use a public health problem in Mexico? [J]. Environ Health Perspect, 1997, 104 (6) : 584-588.
- [21] MISHIMA C, KAGARA N, TANEI T, et al. Loss of imprinting of IGF2 in fibroadenomas and phyllodes tumors of the breast [J]. Oncol Rep, 2016, 35 (3) : 1511-1518.
- [22] TIAN F, TANG Z, SONG G, et al. Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypomethylation of the H19 differentially methylated region in the tumor tissue of colorectal cancer patients [J]. Mol Med Rep, 2012, 5 (6) : 1536-1540.
- [23] ZHAO X, LIU X, WANG G. Loss of insulin-like growth factor II imprinting is a hallmark associated with enhanced chemo/radiotherapy resistance in cancer stem cells [J]. Oncotarget, 2016, 7 (32) : 51349-51364.
- [24] OZAKI S, KAWAHARA E, MAENAKA S, et al. Distinct allelic expression patterns of imprinted IGF2 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung [J]. Oncol Lett, 2014, 8 (6) : 2561-2564.
- [25] LIU H, LI W, ZHAO S, et al. Folic acid attenuates the effects of amyloid β oligomers on DNA methylation in neuronal cells [J]. Eur J Nutr, 2016, 55 (5) : 1849-1862.
- [26] TSEGA A, BINDER A M, MICHELS K B. Impact of folic acid intake during pregnancy on genomic imprinting of *IGF2/H19* and 1-carbon metabolism [J]. FASEB J, 2017, 31 (12) : 5149-5158.
- [27] CASELLAS A, MALLOL C, SALAVERT A, et al. Insulin-like growth factor 2 overexpression induces β -cell dysfunction and increases beta-cell susceptibility to damage [J]. J Biol Chem, 2015, 290 (27) : 16772-16785.
- [28] TANG-PÉRONARD J L, HEITMANN B L, JENSEN T K, et al. Prenatal exposure to persistent organochlorine pollutants is associated with high insulin levels in 5-year-old girls [J]. Environ Res, 2015, 142 : 407-413.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 汪源; 校对: 王晓宇)