

· 论 著 ·

# 肝脏H19在*p,p'*-DDE干扰糖代谢关键基因中的作用

郭晓晨, 高明, 彭雪云, 吴南翔

杭州医学院公共卫生学院, 浙江 杭州 310013

**摘要:** **目的** 研究肝脏长链非编码RNA H19在2, 2-双(4-氯苯基)-1, 1-二氯乙烯(*p,p'*-DDE)干扰糖代谢关键基因中的作用。**方法** 取人胚胎肝细胞(CCC-HEL-1)分为溶剂对照(DMSO)组、0.1 μmol/L *p,p'*-DDE组、1 μmol/L *p,p'*-DDE组、10 μmol/L *p,p'*-DDE组、siRNA+DMSO组、siRNA+10 μmol/L *p,p'*-DDE组; 分别采用亚硫酸氢盐法、实时荧光定量PCR法和BCA法检测各组肝细胞核因子4α(HNF4α)、叉头框转录因子O1(FoxO1)和胰岛素样生长因子2(IGF2)的启动子区域甲基化、mRNA表达和蛋白表达水平; 比较各组H19 mRNA表达水平和相关基因启动子区域甲基化水平及后续转录表达的变化。**结果** 不同剂量*p,p'*-DDE单独暴露后, H19表达增加, 10 μmol/L *p,p'*-DDE组 H19 mRNA表达水平高于DMSO组(1.31±0.25和1.02±0.22;  $P<0.05$ )。与DMSO组比较, 10 μmol/L *p,p'*-DDE组HNF4α基因启动子甲基化水平降低[(38.59±32.77)%和(61.43±24.64)%]、mRNA表达水平升高(1.33±0.26和1.03±0.28), 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); FoxO1和IGF2基因启动子甲基化、mRNA和蛋白表达水平无明显变化( $P>0.05$ )。经siRNA转染H19沉默后, 与10 μmol/L *p,p'*-DDE组比较, siRNA+DMSO组HNF4α基因启动子甲基化水平升高[(71.33±22.23)%和(38.59±32.78)%]、mRNA表达水平降低(0.71±0.17和1.33±0.26), FoxO1基因启动子甲基化水平升高[(47.73±34.24)%和(25.09±25.35)%]、IGF2 mRNA表达水平升高(1.39±0.25和0.80±0.20), 并且IGF2蛋白表达水平高于DMSO组(1.03±0.11和0.74±0.12), 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 肝细胞H19可通过调节基因启动子甲基化修饰程度, 改变HNF4α、FoxO1和IGF2的转录与表达, 在*p,p'*-DDE暴露诱发的糖稳态失调中发挥作用。

**关键词:** H19; *p,p'*-DDE; 甲基化; 糖代谢

中图分类号: R589.1

文献标识码: A

文章编号: 2096-5087(2022)07-0659-06

## Role of hepatic H19 expression in glucose metabolism disorder induced by *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene

GUO Xiaochen, GAO Ming, PENG Xueyun, WU Nanxiang

School of Public Health, Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310013, China

**Abstract: Objective** To investigate the role of hepatic long-chain non-coding RNA (lncRNA) H19 in key genes associated with glucose metabolism disorder induced by *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE). **Methods** Human embryonic liver CCC-HEL-1 cells were divided into the DMSO group, 0.1 μmol/L *p,p'*-DDE group, 1 μmol/L *p,p'*-DDE group, 10 μmol/L *p,p'*-DDE group, small interference RNA (siRNA)+DMSO group and siRNA+10 μmol/L *p,p'*-DDE group. The promoter region methylation, mRNA expression and protein expression of hepatocyte nuclear factor 4α (HNF4α), forkhead box transcription factor O1 (FoxO1) and insulin-like growth factor (IGF2) were detected in CCC-HEL-1 cells using the bisulfite method, real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) assay and BCA assay, respectively. The changes in H19 mRNA expression, the methylation of associated genes in the promoter region and transcriptional expression were compared in CCC-HEL-1 among groups. **Results** Exposure to *p,p'*-DDE alone at different doses resulted in an increase in H19 expression, and the H19 mRNA expression was higher in the 10 μmol/L *p,p'*-DDE group than in the DMSO group [(1.31±0.25) vs. (1.02±0.22);  $P<0.05$ ]. Lower methylation of the HNF4α gene in the pro-

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2022.07.003

基金项目: 浙江省自然科学基金(LQ20H260001)

作者简介: 郭晓晨, 硕士研究生在读

通信作者: 吴南翔, E-mail: zamewu@163.com

moter region [(38.59±32.77)% vs. (61.43±24.64)%;  $P<0.05$ ] and higher HNF4 $\alpha$  mRNA expression [(1.33±0.26) vs. (1.03±0.28);  $P<0.05$ ] were detected in the 10  $\mu\text{mol/L}$   $p,p'$ -DDE group than in the DMSO group, while no significant differences were detected between the two groups in terms of the methylation of FoxO1 and IGF2 genes in the promoter region, FoxO1 and IGF2 mRNA and protein expression ( $P>0.05$ ). Following siRNA-induced H19 knockdown, higher methylation of the HNF4 $\alpha$  gene in the promoter region [(71.33±22.23)% vs. (38.59±32.78)%;  $P<0.05$ ], lower HNF4 $\alpha$  mRNA expression [(0.71±0.17) vs. (1.33±0.26);  $P<0.05$ ], higher methylation of FoxO1 gene in the promoter region [(47.73±34.24)% vs. (25.09±25.35)%;  $P<0.05$ ] and higher IGF2 mRNA [(1.39±0.25) vs. (0.80±0.20);  $P<0.05$ ] were found in the siRNA+DMSO group than in the 10  $\mu\text{mol/L}$   $p,p'$ -DDE group, and higher IGF2 protein expression was detected in the siRNA+DMSO group than in the DMSO group [(1.03±0.11) vs. (0.74±0.12);  $P<0.05$ ]. **Conclusion** Hepatic H19 may alter HNF4 $\alpha$ , FoxO1 and IGF2 transcription and expression through mediating the methylation of genes in the promoter region, thereby playing a role in  $p,p'$ -DDE-induced glucose metabolism disorders.

**Keywords:** H19;  $p,p'$ -dichlorodiphenyldichloroethylene; methylation; glucose metabolism

2,2-双(4-氯苯基)-1,1-二氯乙烯 ( $p,p'$ -dichlorodiphenyldichloroethylene,  $p,p'$ -DDE) 是有机氯农药滴滴涕在生物体内的主要代谢产物和环境残留标志物。大量流行病学及实验研究表明,  $p,p'$ -DDE 可干扰胰岛素分泌和糖代谢, 增加 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 发生风险<sup>[1-3]</sup>。H19 作为最早被发现的长链非编码 RNA, 在表观遗传调控和细胞增殖分化过程中发挥重要作用, 可通过多种途径调节靶基因启动子甲基化状态, 进而影响基因的转录表达<sup>[4]</sup>。H19 是当前糖尿病表观遗传学研究的热点, 有研究显示, H19 表达通过激活 AMPK 增强胰岛素的敏感性, 调节全身性胰岛素稳态<sup>[5]</sup>。本研究采用体外靶向沉默技术, 观察 H19 在  $p,p'$ -DDE 干扰肝脏糖稳态调节关键基因肝细胞核因子 4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ )、叉头框转录因子 O1 (forkhead box transcription factor O1, FoxO1) 和胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor, IGF2) 表达中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与仪器**  $p,p'$ -DDE (美国 Sigma 公司)、反转录试剂盒 (日本 TaKaRa)、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa)、20% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程有限公司)、DEME 高糖培养基 (美国 Gibco 公司)、siRNA-Mate 转染试剂 (上海翊圣生物科技有限公司)、小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 引物 (吉玛基因)、DMSO (美国 Sigma 公司)、ECL 发光液 (中国 Biosharp 公司)、Tris (美国 Sigma 公司)、Tween-20 (德国 Biofroxx)、抗体 (华安生物技术有限公司)、聚偏二氟乙烯膜 (美国 Millipore 公司)、Synergy2 酶标仪 (美国 Biotek)、CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Thermo 公司)、低温高速离心机 (湖

南湘仪离心机仪器有限公司)、实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 仪 (美国 Thermo 公司)、核酸蛋白分析仪 (美国 Thermo 公司)、电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司)。

**1.2 细胞培养** 人胚胎肝细胞 (CCC-HEL-1) 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心, 培养于含 20% 胎牛血清的 DEME 高糖培养基中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。

**1.3 siRNA 转染沉默 H19** 将 CCC-HEL-1 细胞接种于 6 孔板中, 每孔加入约 2 mL 无抗生素的培养基, 使转染时的细胞密度在 40%~60% 之间为宜。取 8  $\mu\text{L}$ /孔 siRNA-Mate 转染试剂, 用 100  $\mu\text{L}$  无血清培养液稀释, 混合后室温静置 5 min。分别取 2、3、4  $\mu\text{L}$  设计合成的 siRNA 引物 H19-1524, H19-2017, H19-2313, 以及 siRNA  $\beta$ -Actin (阳性对照) 和 siRNA NC (阴性对照) 于 100  $\mu\text{L}$  无血清培养基中, 混匀后室温静置 15 min, 再与转染试剂混合形成转染复合物。将 siRNA 转染试剂混合液加入细胞培养板中, 轻轻混合, 放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 转染 24 h 后提取 RNA, 采用实时荧光定量 RT-qPCR 法检测 H19 沉默水平, 对 Ct 值进行统计分析, 选择最佳引物及转染浓度。

**1.4  $p,p'$ -DDE 暴露及分组** CCC-HEL-1 细胞分为 6 组, 其中 4 组先用 siRNA NC 处理 24 h, 2 组先用 siRNA 靶向沉默 H19 转染 24 h, 再各加入不同剂量的  $p,p'$ -DDE 处理 24 h。 $p,p'$ -DDE 暴露剂量参考文献<sup>[6]</sup>。最终分为溶剂对照 (DMSO) 组、0.1  $\mu\text{mol/L}$   $p,p'$ -DDE 组、1  $\mu\text{mol/L}$   $p,p'$ -DDE 组、10  $\mu\text{mol/L}$   $p,p'$ -DDE 组、siRNA+DMSO 组、siRNA+10  $\mu\text{mol/L}$   $p,p'$ -DDE 组。

**1.5 H19 及相关基因的 mRNA 表达检测** Trizol 法提取上述各组细胞总 RNA, 反转录后采用 RT-qPCR 法测定 H19、HNF4 $\alpha$ 、FoxO1 和 IGF2 的 mRNA 表

达水平,各引物序列见表1。反应条件:95℃预变性30s,95℃变性5s,60℃退火延伸31s,40个

循环,再作熔解曲线分析。每个样本设3个复孔,取其平均Ct值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法解析基因mRNA表达。

表1 H19及相关基因的引物序列  
Table 1 Primer sequences of H19 and key genes

基因 Gene	上游引物 Upstream primers	下游引物 Downstream primers
H19-human	CITTTACAACCACTGCACTACCTG	GCCATGAAGATGGAGTCGCCG
IGF2-human	TGAGATCCAAAACGCTTCGA	CGGCGAGGCAGAATATAACAC
HNF4 $\alpha$ -human	TGCGACTCTCCAAAACCCCTC	ATTGCCCATCGTCAACACCT
FoxO1-human	TTGAATTCACCCAGCCCAAACCT	GCTACCCCAGGATCAACTGGTG
$\beta$ -Actin-human	CCTGGCACCCAGCACAAAT	GCCGATCCACACGGAGTACT

1.6 HNF4 $\alpha$ 、FoxO1和IGF2蛋白表达检测 收集各组细胞,加入一定量裂解液,离心半径10cm、12000r/min、4℃离心5min,提取总蛋白。采用BCA法测定HNF4 $\alpha$ 、FoxO1和IGF2蛋白浓度,再进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),浓缩胶内电压为80V,待样品进入分离胶后将电压调至120V,并将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上,转膜条件为400mA,75min。随后将膜置于含5%脱脂奶粉的TBST(Tris缓冲盐溶液,0.1%Tween 20)中封闭2h,再与一抗一起4℃孵育过夜,洗膜后与二抗一起孵育2h,洗膜后进行化学发光、显影并对结果进行分析。

1.7 HNF4 $\alpha$ 、FoxO1和IGF2基因启动子区域甲基化水平检测 采用亚硫酸氢盐测序法、柱式法提取各组细胞DNA,经亚硫酸氢钠处理后,设计甲基化特异性引物扩增HNF4 $\alpha$ 、FoxO1和IGF2基因启动子区目的片段。PCR产物进行纯化质控后,使用高通量测序仪,采用片段末端测序法对插入片段进行测序分析,根据目标序列的定位和甲基化状态的量化评价各基因启动子区域甲基化水平。

1.8 统计分析 采用SPSS 25.0软件统计分析。定量资料服从正态分布,采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )描述,组间比较采用单因素方差分析;进一步两两比较采用LSD或Tamhane's T2检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 H19靶向沉默条件的确定 经特异性siRNA引物转染24h后,H19 mRNA表达受到不同程度的抑制。H19-1524、H19-2017转染后,不同转染浓度组H19的Ct值比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。两两比较结果显示,H19-1524(转染浓度为

20、30、40nmol/L)、H19-2017(转染浓度为30、40nmol/L)转染后H19的Ct值均高于siRNA NC组( $P<0.05$ )。见表2。考虑沉默效果及转染试剂剂量效应关系,最终选择30nmol/L H19-2017作为特异性siRNA引物。

表2 不同siRNA引物转染后H19 Ct值比较( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 2 Ct values of H19 after transfection of different siRNA primers ( $\bar{x}\pm s$ )

组别 Group	H19-1524	H19-2017	H19-2313
siRNA NC	29.74 $\pm$ 0.82	29.74 $\pm$ 0.82	29.74 $\pm$ 0.82
20 nmol/L	31.45 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	30.65 $\pm$ 0.90	31.20 $\pm$ 0.49
30 nmol/L	33.79 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	32.47 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	30.46 $\pm$ 1.25
40 nmol/L	33.34 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	33.14 $\pm$ 1.70 <sup>a</sup>	31.79 $\pm$ 1.49
F值	20.011	5.309	2.027
P值	<0.001	0.026	0.189

注:a表示与siRNA NC组比较, $P<0.05$ 。Note: a,  $P<0.05$  compared with siRNA NC group.

2.2 HNF4 $\alpha$ 、FoxO1和IGF2启动子区域甲基化水平 各组CCC-HEL-1细胞HNF4 $\alpha$ 、FoxO1和IGF2启动子区域甲基化水平比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。两两比较结果显示,10 $\mu$ mol/L  $p,p'$ -DDE组HNF4 $\alpha$ 启动子区域甲基化水平低于DMSO组( $P<0.05$ ),siRNA+DMSO组高于10 $\mu$ mol/L  $p,p'$ -DDE组( $P<0.01$ ); siRNA+DMSO组FoxO1启动子区域甲基化水平高于DMSO组和10 $\mu$ mol/L  $p,p'$ -DDE组( $P<0.05$ )。见表3。

2.3 HNF4 $\alpha$ 、FoxO1、IGF2及H19 mRNA表达水平 各组CCC-HEL-1细胞H19、HNF4 $\alpha$ 和IGF2的mRNA相对表达量比较,差异均有统计学意义( $P<$

表3 各组 HNF4α、FoxO1 和 IGF2 启动子区域  
甲基化水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ , %)

Table 3 Comparison of methylation levels of promoter regions of  
HNF4α, FoxO1 and IGF2 in each group ( $\bar{x}\pm s$ , %)

组别 Group	HNF4α	FoxO1	IGF2
DMSO	61.43±24.64	28.26±23.98	3.72±4.78
0.1 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	56.66±25.71	29.90±25.29	3.63±4.60
1 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	51.99±26.37	29.71±22.39	4.41±6.53
10 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	38.59±32.77 <sup>a</sup>	25.09±25.35	4.58±6.03
siRNA+DMSO	71.33±22.23 <sup>b</sup>	47.73±34.24 <sup>ab</sup>	1.87±2.85
siRNA+10 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	54.78±21.35	38.14±31.27	3.22±5.05
F值	2.114	1.486	0.985
P值	0.075	0.202	0.429

注: a表示与DMSO组比较,  $P<0.05$ ; b表示与10 μmol/L *p,p'*-DDE组比较,  $P<0.05$ 。Note: a,  $P<0.05$  compared with DMSO group; b,  $P<0.05$  compared with 10 μmol/L *p,p'*-DDE group.

表4 各组 HNF4α、FoxO1、IGF2 及 H19 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 4 Comparison of relative mRNA expression of HNF4α, FoxO1, IGF2 and H19 in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别 Group	H19	HNF4α	FoxO1	IGF2
DMSO	1.02±0.22	1.03±0.28	1.04±0.32	1.01±0.15
0.1 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	1.14±0.15	1.11±0.19	0.91±0.45	0.96±0.25
1 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	1.12±0.16	1.08±0.24	0.85±0.21	0.99±0.24
10 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	1.31±0.25 <sup>a</sup>	1.33±0.26 <sup>a</sup>	0.89±0.19	0.80±0.20
siRNA+DMSO	0.52±0.13 <sup>ab</sup>	0.71±0.17 <sup>ab</sup>	0.74±0.19	1.39±0.25 <sup>ab</sup>
siRNA+10 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	0.67±0.25 <sup>ab</sup>	0.98±0.16 <sup>b</sup>	0.80±0.36	1.01±0.40
F值	11.548	4.114	0.552	2.771
P值	<0.001	0.008	0.735	0.041

注: a表示与DMSO组比较,  $P<0.05$ ; b表示与10 μmol/L *p,p'*-DDE组比较,  $P<0.05$ 。Note: a,  $P<0.05$  compared with DMSO group; b,  $P<0.05$  compared with 10 μmol/L *p,p'*-DDE group.

表5 各组 HNF4α、FoxO1 和 IGF2 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 5 Comparison of relative protein expression of HNF4α,  
FoxO1 and IGF2 in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别 Group	HNF4α	FoxO1	IGF2
DMSO	0.62±0.25	1.67±0.53	0.74±0.12
0.1 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	0.89±0.36	1.59±0.71	0.88±0.13
1 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	0.85±0.34	1.47±0.59	0.87±0.12
10 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	1.01±0.27	1.28±0.25	0.74±0.12
siRNA+DMSO	1.33±0.17 <sup>a</sup>	0.91±0.18	1.03±0.11 <sup>a</sup>
siRNA+10 μmol/L <i>p,p'</i> -DDE	0.89±0.35	0.93±0.21	0.54±0.12
F值	1.805	1.532	5.830
P值	0.186	0.252	0.006

注: a表示与DMSO组比较,  $P<0.05$ 。Note: a,  $P<0.05$  compared with DMSO group.

0.05)。两两比较结果显示, 10 μmol/L *p,p'*-DDE 组 H19、HNF4α 的 mRNA 相对表达量高于 DMSO 组 ( $P<0.05$ ); siRNA + DMSO 组 H19 和 HNF4α 的 mRNA 相对表达量低于 DMSO 组和 10 μmol/L *p,p'*-DDE 组, IGF2 的 mRNA 相对表达量高于 DMSO 组和 10 μmol/L *p,p'*-DDE 组 ( $P<0.05$ ); siRNA+10 μmol/L *p,p'*-DDE 组 H19 mRNA 相对表达量低于 DMSO 组和 10 μmol/L *p,p'*-DDE 组, HNF4α mRNA 相对表达量低于 10 μmol/L *p,p'*-DDE 组 ( $P<0.05$ )。见表 4。

2.4 HNF4α、FoxO1 和 IGF2 蛋白表达水平 各组 CCC-HEL-1 细胞 IGF2 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 各组 HNF4α 和 FoxO1 蛋白相对表达量差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。两两比较结果显示, siRNA+DMSO 组 HNF4α 和 IGF2 蛋白相对表达量高于 DMSO 组 ( $P<0.05$ )。见表 5。

### 3 讨论

*p,p'*-DDE 是近年来研究发现与糖尿病发生发展相关性较为显著的一种环境持久性有机污染物, 但其致病机理尚未阐明。有研究显示, 孕期大鼠暴露于 *p,p'*-DDE 可导致仔鼠胰岛细胞启动子区域甲基化状态改变, 影响 IGF2 基因转录, 并伴有仔鼠糖耐量受损<sup>[7]</sup>。H19 可通过 let-7<sup>[8]</sup>、SAHH<sup>[9]</sup>、结合组蛋白<sup>[10]</sup>等多种途径调节靶基因启动子甲基化状态, 进而干预关键基因的转录表达。HNF4α、FoxO1 和 IGF2 是肝脏自身分化成熟及糖代谢的关键基因。HNF4α 调节肝脏许多基因的表达, 是肝细胞代谢和分化的关键基因<sup>[11]</sup>, 在糖异生基因的表达调控中也

不可或缺,其正常表达与否和胰岛素抵抗密切相关<sup>[12]</sup>。FoxO1在胰岛素信号传递中起着重要作用,调节机体糖代谢,在肝糖原异生过程中起主导作用<sup>[13-14]</sup>。IGF2作为胰岛素样生长因子家族的重要成员,与胰岛素在结构上具有高度同源性,故能够高亲和力和力地结合胰岛素受体,参与细胞分化、存活、迁移、糖代谢,维持细胞正常的生理功能<sup>[15]</sup>。本实验将CCC-HEL-1细胞暴露于 $p,p'$ -DDE,并抑制H19表达,通过测定关键基因HNF4 $\alpha$ 、FoxO1、IGF2的甲基化和表达水平,探究H19在 $p,p'$ -DDE暴露引起的糖代谢紊乱中发挥的作用,为 $p,p'$ -DDE致糖尿病机制研究提供实验依据。

本实验中 $p,p'$ -DDE暴露剂量参考了PAVLIKOVA等<sup>[6]</sup>的研究,选择敏感剂量0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$ ,可影响细胞中mRNA加工、蛋白质表达和葡萄糖代谢。经不同剂量 $p,p'$ -DDE暴露后,CCC-HEL-1细胞的H19表达升高,10  $\mu\text{mol/L}$   $p,p'$ -DDE组H19表达水平显著高于溶剂对照组;HNF4 $\alpha$ 启动子区域发生去甲基化,高剂量组甲基化水平显著降低,mRNA表达显著升高。对细胞进行H19特异性沉默处理后,HNF4 $\alpha$ 基因启动子区域甲基化程度显著升高,mRNA表达下调,而蛋白则出现意外的过表达现象;FoxO1基因启动子区域甲基化程度升高,mRNA表达未见明显差异,蛋白表达呈现下降趋势。IGF2作为H19印记基因,启动子区域发生去甲基化,mRNA和蛋白表达升高。这提示 $p,p'$ -DDE暴露后通过H19对关键基因启动子区域的甲基化修饰影响基因转录和蛋白表达。此外,HNF4 $\alpha$ 蛋白的过表达可能与H19介导的微小RNA(microRNA, miRNA)转录后调控相关。H19通过不同的机制对miRNAs发挥调控作用,而miRNAs作为内源性的非编码RNA分子,可以通过靶向mRNA的3'-UTR序列特异性区域并抑制其翻译成蛋白质来介导基因表达的转录后调控。HNF4 $\alpha$ 是许多miRNAs的基因靶点<sup>[16]</sup>,H19通过miRNAs调控HNF4 $\alpha$ 的表达是一个多因素的过程,它们之间的关系还需进行后续研究。

综上所述,肝细胞中H19可以调节目的基因启动子甲基化水平,进而改变肝脏糖代谢关键基因HNF4 $\alpha$ 、FoxO1、IGF2的转录与表达,可能在 $p,p'$ -DDE暴露诱发的机体糖稳态失调中发挥作用。H19介导 $p,p'$ -DDE诱发2型糖尿病的主要机制可能是 $p,p'$ -DDE暴露损伤胰岛 $\beta$ 细胞导致的胰岛素分泌不足,但H19在肝脏中诱发糖代谢紊乱的机制同样不可忽视。而胰腺组织中H19调控的基因启动子甲基化在 $p,p'$ -DDE

暴露诱发胰岛 $\beta$ 细胞损伤中的作用仍有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] HERNÁNDEZ-MARIANO J Á, BALTAZAR-REYES M C, SALAZAR-MARTÍNEZ E, et al. Exposure to the pesticide DDT and risk of diabetes and hypertension: systematic review and meta-analysis of prospective studies [J/OL]. *Int J Hyg Environ Health*, 2022, 239 [2022-04-20]. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113865>.
- [2] WARD A B, DAIL M B, CHAMBERS J E. *In Vitro* effect of DDE exposure on the regulation of lipid metabolism and secretion in McA-RH7777 hepatocytes: a potential role in dyslipidemia which may increase the risk of type 2 diabetes mellitus [J]. *Toxicol In Vitro*, 2016, 37: 9-14.
- [3] 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.
- [4] CHEN C, LIU W R, ZHANG B, et al. LncRNA H19 downregulation confers erlotinib resistance through upregulation of PKM2 and phosphorylation of AKT in EGFR-mutant lung cancers [J]. *Cancer Lett*, 2020, 486: 58-70.
- [5] GENG T, LIU Y, XU Y, et al. H19 lncRNA promotes skeletal muscle insulin sensitivity in part by targeting AMPK [J]. *Diabetes*, 2018, 67 (11): 2183-2198.
- [6] 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.
- [7] 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 L J, 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.
- [8] SANCHEZ-PARRA C, JACOVETTI C, DUMORTIER O, et al. Contribution of the long noncoding RNA H19 to  $\beta$ -cell mass expansion in neonatal and adult rodents [J]. *Diabetes*, 2018, 67 (11): 2254-2267.
- [9] FU Y, WANG W B, LI X J, et al. LncRNA H19 interacts with S-adenosylhomocysteine hydrolase to regulate LINE-1 Methylation in human lung-derived cells exposed to Benzo [a] pyrene [J]. *Chemosphere*, 2018, 207: 84-90.
- [10] HU X T, XING W, ZHAO R S, et al. HDAC2 inhibits EMT-mediated cancer metastasis by downregulating the long noncoding RNA H19 in colorectal cancer [J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39 (1) [2022-04-20]. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01783-9>.
- [11] 马润,杨红英. 肝细胞核因子4 $\alpha$ 与糖尿病[J]. *实验与检验医学*, 2011, 29 (6): 583-586.  
MA R, YANG H Y. Correlation between hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  and diabetes [J]. *Exp Lab Med*, 2011, 29 (6): 583-586.

- [12] YE H M M, BOSCH D E, DAOUD S S. Role of hepatocyte nuclear factor 4- $\alpha$  in gastrointestinal and liver diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25 (30): 4074-4091.
- [13] 魏爽, 李冀, 付强, 等. 黄芪-葛根药对通过 PI3K/Akt/FoxO1 通路调控糖异生作用治疗糖尿病大鼠作用机制 [J/OL]. *中华中医药学刊* [2022-04-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20220321.1537.002.html>.
- WEI S, LI J, FU Q, et al. Mechanism of Astragali Radix-Puerariae Lobatae Radix Herb Pair regulates gluconeogenesis through PI3K/Akt/FoxO1 pathway in diabetic rats [J/OL]. *Chin Arch Tradit Chin Med* [2022-04-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20220321.1537.002.html>.
- [14] LEE S, DONG H H. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism [J]. *J Endocrinol*, 2017, 233 (2): R67-R79.
- [15] 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.
- LIU F, PENG Y H, TANG J Z, et al. Effect of the imprinting loss of insulin like growth factor 2 gene during the differentiation from mouse embryonic stem cells to islet-like cells *in vitro* [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2017, 21 (9): 1362-1367.
- [16] LUO J, XIE M Y, HOU Y F, et al. A novel epigenetic mechanism unravels hsa-miR-148a-3p-mediated CYP2B6 downregulation in alcoholic hepatitis disease [J/OL]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 188 [2022-04-22]. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114582>.
- 收稿日期: 2022-01-24 修回日期: 2022-04-20 本文编辑: 徐文璐

### (上接第 658 页)

- [13] 朱素娟, 王衡, 徐卫民, 等. 浙江省首例境外输入性埃及血吸虫病病例报告 [J]. *预防医学*, 2016, 28 (10): 1021-1022.
- ZHU S J, WANG H, XU W M, et al. A report on the first imported case of *Schistosomiasis haematobia* in Zhejiang Province [J]. *Prev Med*, 2016, 28 (10): 1021-1022.
- [14] 吴忠道, 宋兰桂, 刘超, 等. 我国寄生虫病防控面临的新挑战与新要求 [J]. *热带医学杂志*, 2019, 19 (1): 1-3, 8.
- WU Z D, SONG L G, LIU C, et al. New challenges and requirements for parasitic diseases control in China [J]. *J Trop Med*, 2019, 19 (1): 1-3, 8.
- [15] WANG J L, LI T T, HUANG S Y, et al. Major parasitic diseases of poverty in mainland China: perspectives for better control [J/OL]. *Infect Dis Poverty*, 2016 [2022-04-26]. <http://doi.org/10.1186/s40249-016-0159-0>.
- [16] 王毓, 谢朝勇. 南京市血吸虫病传播控制后钉螺控制效果分析及对策探讨 [J]. *中国热带医学*, 2019, 19 (8): 743-746, 775.
- WANG Y, XIE C Y. Analysis and countermeasures of control effect of *Oncomelania* snails after schistosomiasis transmission controlled in Nanjing [J]. *China Trop Med*, 2019, 19 (8): 743-746, 775.
- [17] 李新祥, 王萍, 李冰. 江山市钉螺分布调查 [J]. *预防医学*, 2019, 31 (8): 833-837.
- LI X X, WANG P, LI B. Spatial distribution of oncomelania in Jiangshan [J]. *Prev Med*, 2019, 31 (8): 833-837.
- [18] HAO Y W, WANG Q, CAO C L, et al. Construction and application of surveillance and response systems for parasitic diseases in China, led by NIPD-CTDR [J]. *Adv Parasitol*, 2020, 110: 349-371.
- [19] 汪伟, 杨坤. 再送“瘟神”: 消除血吸虫病适宜技术最新研究进展 [J]. *预防医学情报杂志*, 2019, 35 (11): 1314-1320.
- WANG W, YANG K. Farewell to the god of plague: review of latest advances in the technology used in the National Schistosomiasis Elimination Programme of China [J]. *J Prev Med Inf*, 2019, 35 (11): 1314-1320.
- [20] WANG W, YANG K. Schistosomiasis and the global goals [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382 (16): 1575-1576.
- 收稿日期: 2022-02-23 修回日期: 2022-04-26 本文编辑: 徐文璐