

高糖饮食抑制后代雄性果蝇寿命和育性及其作用机制

文明明, 毕洁*, 贺艳萍, 戴煌, 张威, 舒在习, 肖安红

(武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023)

摘要: 该文研究了高糖饮食对后代雄性黑腹果蝇的寿命和育性的影响。通过构建高糖果蝇模型, 测定果蝇的寿命、运动能力和胚胎孵化率。采用酶活力测定方法检测果蝇体内总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)活力和丙二醛(MDA)含量; 采用细胞核DAPI染色并结合拉曼光谱和拉曼成像观察了组织细胞结构和生物化学成分的变化; 运用转录组测序和荧光定量PCR从基因水平探明影响其变化的机理。结果显示, 与对照组相比, 高糖组雄蝇的寿命显著缩短, 中位生存期由34 d缩短到29 d ($p<0.01$), 运动能力显著降低, 约为对照组的46.32% ($p<0.01$); 同时, 高糖组雄蝇体内的T-SOD和CAT活性显著降低, 分别为对照组的83.47% ($p<0.01$)和79.47% ($p<0.01$), 而MDA含量极显著增加, 为对照组含量的1.51倍 ($p<0.01$); 高糖组雄蝇的胚胎孵化率显著降低, 由88.08%缩短到70.77% ($p<0.01$); 精巢DAPI染色结果表明精巢组织膨大异常, 储精囊中没有明显的精子束; 拉曼光谱表明高糖组雄蝇精巢组织中核酸和蛋白质等成分显著减少, 拉曼成像也呈现不规则分布; 转录组测序提示, 高糖组差异表达基因富集在应激反应、发育过程和繁殖等方面。本研究证实了高糖饮食降低了雄蝇的寿命、运动能力和育性, 可能是通过加剧氧化应激反应造成损伤。

关键词: 高糖饮食; 黑腹果蝇; 寿命; 育性; 转录组

文章编号: 1673-9078(2022)10-9-18

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.10.1402

Lifespan and Fertility of Male *Drosophila melanogaster* Decreased by A High-sucrose Diet and the Related Mechanisms

WEN Mingming, BI Jie*, HE Yanping, DAI Huang, ZHANG Wei, SHU Zaixi, XIAO Anhong

(School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: The effects of a high-sucrose diet on the lifespan and fertility of male *Drosophila melanogaster* were studied. The lifespan, exercise ability, and hatch rate of *D. melanogaster* were measured after fly model establishment. Additionally, T-SOD and CAT activities and MDA content in *D. melanogaster* were measured by enzyme activity assay. DAPI staining, Raman spectroscopy, and Raman imaging were used to observe changes in the cell structure and biochemical components. Moreover, transcriptome sequencing and fluorescence quantitative PCR were utilized to investigate the mechanisms of these changes at the gene level. The results showed that, compared with those in the control group, the life span of male flies in the high-sucrose diet group was significantly shortened; the median lifespan decreased from 34 days to 29 days ($p<0.01$). Similarly, the exercise ability of this experimental group decreased significantly, to approximately 46.32% of that of the control group ($p<0.01$). Moreover, T-SOD and CAT activities of male flies in the high-sucrose diet group significantly decreased to 83.47% ($p<0.01$) and 79.47% ($p<0.01$), respectively, compared to those in the control group. However, MDA content of the high-sucrose diet group increased significantly to 1.51 times that of the control group ($p<0.01$). Furthermore, the embryo hatch rate of male flies significantly decreased, from 88.08% in the control group to 70.77% ($p<0.01$) in the experimental group. DAPI staining showed abnormal enlargement of the testis and no sperm bundles in the seminal vesicles of the experimental group. Raman spectroscopy revealed that nucleic acid and protein components in the testis tissue of male flies in the high-sucrose diet group decreased significantly compared to those in the control group;

引文格式:

文明明, 毕洁, 贺艳萍, 等. 高糖饮食抑制后代雄性果蝇寿命和育性及其作用机制[J]. 现代食品科技, 2022, 38(10): 9-18

WEN Mingming, BI Jie, HE Yanping, et al. Lifespan and fertility of male *Drosophila melanogaster* decreased by a high-sucrose diet and the related mechanisms [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(10): 9-18

收稿日期: 2021-12-13

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(32102198); 湖北省自然科学基金青年项目(2021CFB195); 武汉轻工大学大宗粮油精深加工教育部重点实验室开放课题(2019GYBQGDKFB07; 2020JYBQGDKFA01); 武汉轻工大学校立科研杰青项目

作者简介: 文明明(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养, E-mail: 2237424773@qq.com

通讯作者: 毕洁 (1990-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养, E-mail: 271816367@qq.com

additionally, Raman imaging indicated irregular distributions. Transcriptome sequencing suggested that differentially expressed genes were enriched in aspects of stress response, development, and reproduction in the experimental group. Therefore, this study indicates that a high-sucrose diet reduces the longevity, exercise ability, and fertility of male flies and causes damage by aggravating oxidative stress responses.

Key words: high-sucrose diet; *Drosophila melanogaster*; life span; fertility; transcriptome

在现代食品工业中, 糖被添加到各种食品中。添加糖指非自然存在于食物中的糖, 即在食品生产和制备过程中添加的糖, 包括原糖、白糖和红糖、蜂蜜和糖浆^[1]。食品中添加糖具有多种功能, 如发酵、保鲜等作用, 同时还可以满足消费者对甜味的偏好^[2]。遗憾的是, 糖的过多摄入是导致多种疾病的主要原因之一。高糖摄入对健康的影响一直是大众关注的重点。过量摄入糖分可能导致能量摄入过高, 从而增加肥胖、心血管疾病和糖尿病的风险^[3-5]。此外, 高糖饮食也可能影响发育、寿命和生育力, 有文献表明, 高糖饮食损伤了机体的抗氧化能力, 造成了氧化应激异常^[6]。而相关研究表明, 活性氧自由基 (Reactive Oxygen Species, ROS) 的产生与寿命和生育力呈负相关。Ku 等^[7]比较 7 种哺乳动物的超氧化物和过氧化氢生成率, 发现 ROS 生成率与寿命之间存在反比关系。Gallo 等^[8]研究两种海洋无脊椎动物和一种哺乳动物的精子氧化状态、线粒体功能和活力, 结果表明在三个被检测的物种中, 精子活力与 ROS 水平和过氧化脂 (LPO) 呈负相关, ROS 通过膜脂的氧化损伤导致精子活力下降。上述研究提示, 高糖饮食对生物体的育性可能具有潜在的影响。因此, 探究高糖饮食对生物体的育性具有一定的理论基础, 同时也提供了一个新的视角来阐释糖分摄入过多的危害。

模式生物黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 具有如下优势: 遗传背景清晰、与人类 70% 的致病基因在进化上高度保守、生存周期短、繁殖量大、饲养成本低等^[9]。此外, 果蝇精子发生包括精原细胞的有丝分裂和精母细胞的减数分裂等过程, 这些过程与哺乳动物的精子发生过程十分相似^[10]。因此, 选用黑腹果蝇作为研究对象, 来研究高糖饮食对后代育性的影响。

目前, 研究者大多采用 DAPI 染精核、透射电镜超薄切片、免疫组化原位杂交和 Western blot 分析等方法研究精子发生过程^[11,12]。近年来, 拉曼光谱分析由于能快速实现对成分和结构的分析和定位、不受样品水分的干扰、可以获得骨架结构方面的信息而日益受到重视。此外, 拉曼分析具有无破坏性和无内源性标签及外源性染色的优势^[13]。生物组织中普遍存在 C-H、C-N、C=O、N-H 和 O-H 等各种基团, 而拉曼光谱能检测出样品不同的化学键的分子振动的信息^[14]。

因此, 拉曼光谱在生物体系的研究中具有很大的优势。研究表明, 采用共焦拉曼光谱研究镉 (Cd) 暴露对小鼠肾脏影响, 结果发现所有生物学结果都与拉曼光谱检测一致^[15]。然而, 拉曼光谱在果蝇精子发生过程方面的应用尚无文献报道。

本文研究了亲代果蝇高糖饮食对后代雄性黑腹果蝇的寿命和育性的影响, 通过给亲代果蝇喂养高蔗糖培养基来构建高糖果蝇模型, 测定后代果蝇寿命和运动能力。重点研究了高糖饮食对后代雄蝇育性的影响, 通过统计后代胚胎孵化率初探亲代高糖饮食对后代雄蝇育性的影响效果, 并借助 DAPI 染精核和共焦拉曼光谱来探究其育性的影响机制。最后本研究采用转录组测序尝试从基因水平上探明亲代果蝇高糖饮食后影响后代果蝇寿命和育性的机理。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

黑腹果蝇品系 (*W¹¹¹⁸*) 由清华大学果蝇中心提供, 并在本单位粮油储藏实验室长期饲养, 培养于恒温光照培养箱中, (25±1) °C、光照 12 h: 黑暗 12 h, 湿度 70% 的条件下。

玉米粉、红糖、安琪酵母和 0.9% 生理盐水来源于市售。总蛋白 (Total protein, TP) 测定试剂盒 (A045-2-2)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒 (A003-1-2)、总超氧化物歧化酶 (Total superoxide dismutase, T-SOD) 试剂盒 (A001-1-2) 和过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 测定试剂盒 (A007-1-1) 均购自南京建成生物工程研究所。蔗糖、丙酸 (分析纯)、无水乙醇 (分析纯) 和冰醋酸 (分析纯) 均购自国药集团化学试剂有限公司。PBS 缓冲液、4% 多聚甲醛组织固定液、10 μg/mL DAPI 染色液、逆转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒均购自 Biosharp 公司。Triton X-100 购自源叶生物。抗荧光淬灭封片剂购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

SPL-450 生化培养箱, 天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司; Kimble 749540-0000 微量电动组织匀浆器,

美国 Kimble; SCIOGEX D3024R 高速冷冻离心机, 美国赛洛捷克; Enspire 多功能酶标仪, 新加坡 Perkin Elmer 公司。PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统和 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪, 美国伯乐 (BIO-RAD) 公司。LS-1200CP 超净工作台, 深圳市蓝思净化科技有限公司; DMI 3000B 倒置荧光显微镜, 德国 Leica 公司; inVia Qontor 共焦显微拉曼光谱成像系统, 雷尼绍 (上海) 贸易公司。

1.3 试验方法

1.3.1 培养基的配制

普通培养基的配制^[16]: 30 g 玉米粉, 30 g 红糖, 2 g 酵母, 2 g 琼脂, 300 mL 的蒸馏水, 加热配制。冷却后, 加入 2 mL 丙酸, 以防止霉菌生长。

高糖培养基的配制, 蔗糖浓度参照张晓月^[17]的实验方法: 100 g 蔗糖, 21 g 玉米粉, 5 g 酵母, 2 g 琼脂, 300 mL 蒸馏水, 加热搅拌均匀后煮沸三次。

胚胎收集盘的配制: 首先称取 4.2 g 琼脂, 6.6 g 蔗糖, 溶于 300 mL 蒸馏水中, 剧烈搅拌, 搅拌均匀后在微波炉中煮沸两次, 使琼脂和蔗糖充分溶解。将培养基冷却至 50~60 °C, 加入 3 mL 无水乙醇和 1.5 mL 冰醋酸, 搅拌均匀。最后加入 30 mL 葡萄汁, 搅拌成透明状。将配制好的培养基倒入灭菌的圆形胚胎收集盘中 (紫外灭菌 30 min), 待培养基凝固, 盖上盖子, 用塑料袋密封, 置于 4 °C 冰箱中保存备用。

1.3.2 高糖模型的构建

将亲代果蝇持续进行高糖饮食处理直至羽化出子一代果蝇, 收集子一代果蝇即为高糖果蝇。具体操作为: 将普通培养基中羽化的 2~3 d 果蝇转入高糖培养基中适应 3 d (亲代), 任其交配, 待第 4 天换瓶转入新的高糖培养基中 (连续换瓶两次后灭掉亲代成蝇), 收集第 4 天后产下的卵, 卵羽化至成蝇 (后代) 即为高糖果蝇。为了保证果蝇的处理效果相同, 每批果蝇控制收集前两瓶的卵。操作示意图见图 1。



图 1 高糖果蝇模型构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of high-sucrose *D. melanogaster* model construction

1.3.3 生存实验

收集普通和高糖培养基中羽化 8 h 内的雄蝇, 分别转入含有对应培养基的培养管中, 每管 20 头, 每组 3 管, 普通培养基为对照组。记录并观察果蝇的生存时间。

1.3.4 攀爬能力的测定

对羽化 8 h 内的雄蝇进行运动能力测试。每管雄蝇 20 头, 适应 3 min 后, 轻轻晃动培养管, 使果蝇落在底部, 果蝇会自发向上爬, 记录 10 s 到达培养管 7 cm 刻度及以上果蝇的数目 (A), 每管果蝇至少测试 5 次, 两次测试间隔至少 1 min, 确保每次晃动的力度相同。普通培养基为对照组。攀爬指数 (Climbing Index, CI) 计算公式为:

$$CI = \frac{A}{B} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A——果蝇向上爬的数量, 头;

B——果蝇总数量, 头。

1.3.5 果蝇体内抗氧化酶的活力及丙二醛含量的测定

选取 1 d 雄蝇, 普通组为对照组, 高糖组为实验组, 进行样品前处理, 按照试剂盒说明书测定相关指标, 测定指标有 T-SOD 和 CAT 活力以及 MDA 含量。

1.3.6 果蝇产卵总数和胚胎孵化率的统计

将 1 d 高糖雄蝇 (40 头), 与 3~5 d 的普通雌性处女蝇 (40 头), 在葡萄汁收集盘中进行交配, 在葡萄汁收集盘中央放置一些酵母粉。24 h 后去除雄蝇, 更换胚胎收集盘。每个重复每天更换一次新的胚胎收集盘, 连续更换 4 d, 更换胚胎收集盘的时候数换下的胚胎收集盘中的总胚胎数, 24~36 h 后, 重新数此收集盘中已孵化的胚胎数, 得出胚胎孵化率。解剖镜下可观察到已经孵化的胚胎只剩下干瘪的卵壳, 而未孵化的则呈饱满的米粒状。对照组为 1 d 普通雄蝇 (40 头) 与 3~5 d 普通雌性处女蝇 (40 头) 交配。每个交配做 3 个生物学重复实验。胚胎孵化率计算公式为:

$$C = \frac{D}{D_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C——胚胎孵化率, %;

D——已孵化的胚胎数;

D₀——收集的胚胎总数。

1.3.7 果蝇精巢 DAPI 染色

1.3.7.1 精巢的解剖

取高糖培养基 (实验组) 和普通培养基 (对照组) 中羽化的 1 d 雄蝇于解剖镜下解剖, 在滴加 w=0.9% 的生理盐水的解剖盘上解剖雄蝇精巢约 30 对, 为了避免

清洗和染色过程中精巢遗失，解剖时需要保留一点黑色的尾端。

1.3.7.2 DAPI 染色步骤

在离心管中加入适量 $w=4\%$ 多聚甲醛溶液，将解剖后的果蝇精巢放入 $w=4\%$ 多聚甲醛溶液中，在室温下固定 30 min；随后用 PBS 缓冲液冲洗数次，冲洗过程将离心管缓慢来回晃动，每次 5 min；小心移去液体，紧接着将 PBT 溶液($\varphi=0.1\%$ Triton X-100+1x PBS) 加入离心管中，在室温下固定 30 min；同样地，移去多余液体，用 1x PBS 冲洗 2 次，5 min/次；接下来，加入少量(约 50 μL) DAPI (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对精巢进行染色，染色时间为 5~10 min。最后，进行压片，在清洗干净的载玻片上滴一滴封片液，将 200 μL 黄色枪头的尖端剪去，小心吸取 2~3 对精巢放于封片液上，用解剖镊和解剖针去除多余组织，将精巢小心摆放好，用滤纸吸去多余的 PBS，盖上盖玻片。将制好的玻片放于倒置荧光显微镜下拍照，选用 10x 物镜。

1.3.8 拉曼光谱的获取及预处理

1.3.8.1 拉曼光谱测量和拉曼成像

选用 532 nm 激光的固体激光器对果蝇精巢进行拉曼成像，以减少可能的荧光信号干扰，其输出功率为 50 MW，扫描样品的激光功率为 20 MW。激光束以 5x 物镜聚焦在样品上。在测试之前，首先进行硅片

校正，出峰位置为 520.5 cm^{-1} 处。对精巢进行单谱扫描，光谱采集的范围为 0~4 000 cm^{-1} ，曝光时间为 10 s。每组样品测试三个，每个样品测试三个不同的点。此外，选取储精囊 200 $\mu\text{m}\times 200 \mu\text{m}$ 区域进行面扫描拉曼成像，曝光时间为 0.01 s，激光功率为 50%。

1.3.8.2 光谱预处理

使用 WIRE 4.0 对数据进行拉曼光谱预处理，包括扣除宇宙射线、背底和噪声滤波等。Origin 2017 数据处理软件对光谱进行归一化处理并分析各样品的平均拉曼光谱。

1.3.9 转录组测序

基于 Illumina Novaseq 6000 测序平台对 1 d 对照组和高糖组雄蝇进行转录组测序，测序实验采用 Illumina TruseqTM RNA sample prep Kit 方法进行文库构建，其操作流程图如图 2 所示。

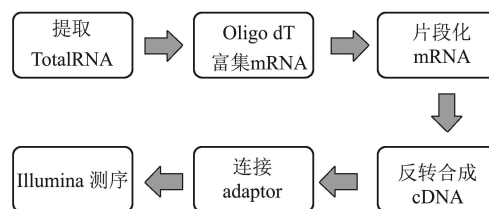


图 2 转录组测序流程图

Fig.2 Flow chart of transcriptome sequencing

表 1 实验中所用引物

Table 1 Primers used in the experiment

Name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Rp49</i>	CGGTTACGGATCGAACAAGC	CTTGCGTTCTTGGAGGAGA
<i>Pepck1</i>	AGTGCTGCGTGCCATCAACC	GAGCCAGACTGCTTCCAT
<i>GstD2</i>	AGAAGCGTGCCGTGAT	CCTCCAGGAAGGTGTGC
<i>ETH</i>	GTCCTGTCTGTTTCGCTCTT	GCTCACTGCGTCTATGC
<i>mthl2</i>	GATTACTTATTCGCCGCC	CACACACATCCTCTCACG
<i>NimC4</i>	AACGAGACGATACGAGCCACA	GCAGCACTCCCTAACCAACCT
<i>sxe2</i>	AAAATGTTGCGGTTTCTTC	TCCCAGGCTGAGTTGAGT
<i>vkg</i>	GCTCCTGTATGATGCGGTTTA	ATCCTGGTCGTCGTTTCG
<i>CheB42a</i>	AGCGATGGTGGATACTTC	CCAGGCGATAGACTTGAC

1.3.10 荧光定量

将提取的总 RNA 在逆转录酶的作用下反转合成 cDNA。将合成的 cDNA 稀释 8 倍，待用。qRT-PCR 反应体系：cDNA 为 2 μL ，上、下游引物分别为 0.3 μL ，SYBR Green qPCR Mix 为 10 μL ，RNase-Free ddH₂O 为 7.4 μL 。采用两步法 PCR 反应程序：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，循环 1 次；随后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s，52~58 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸数据采集 30 s，循环 40 次(具体基因引物见表 1)。目的基因与内参基因(Rp49)之间的相对表达量通过 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 公式计算， $\Delta\text{CT}=\text{CT}$ 目的基因-CTRp49，用

Student's *t* 检验来统计基因表达量之间的差异性。

1.3.11 数据处理

所有实验至少进行三次重复，实验数据采用平均值 \pm 标准差表示。使用 GraphPad Prism 7.0 软件对所有统计数据进行分析 and 绘图，并进行 Student's *t*-检验。生存试验采用 Log-rank 检验来评估寿命的显著性。以 $p<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 高糖饮食对雄蝇寿命的影响

通过连续给雄蝇喂养高糖饮食, 结果表明, 雄蝇的中位生存期由 34 d 缩短到 29 d, 高糖组生存曲线与对照组生存曲线相比极显著缩短 (图 3, $p < 0.0001$)。结合之前的研究, 猜测果蝇寿命的缩短可能是由于糖分摄入量过高损伤了果蝇体内的抗氧化系统^[6]。

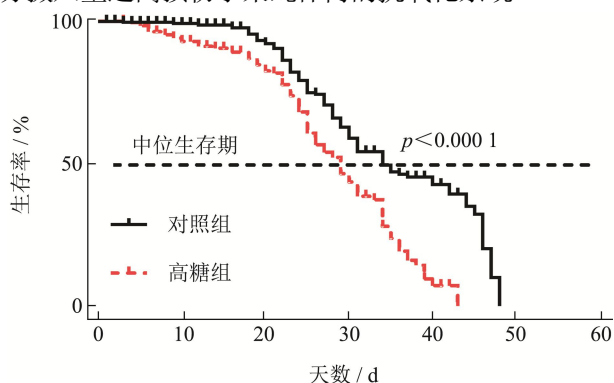


图 3 高糖对果蝇生存曲线的影响

Fig.3 Effect of high sucrose on the survival curve of *D. melanogaster*

2.2 高糖饮食对雄蝇攀爬能力的影响

果蝇具有反趋地性行为, 即在一个垂直的空间内果蝇会自发向上运动^[18]。利用果蝇的这种特性, 测定了果蝇的攀爬能力用来反映果蝇的运动能力。攀爬实验结果表明, 高糖饮食极显著降低了雄蝇的攀爬能力, 损伤了雄蝇的运动能力。高糖组果蝇的攀爬指数由 77% 降低到 35.67%, 约为对照组的 46.32% (图 4, $p < 0.0001$)。

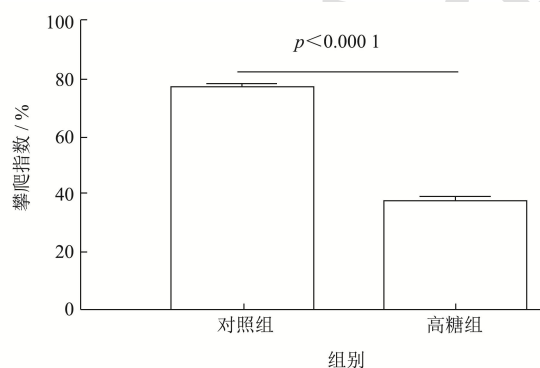


图 4 果蝇运动能力的测定

Fig.4 Exercise ability of *D. melanogaster*

2.3 高糖饮食对雄蝇抗氧化能力的影响

高糖对雄蝇的抗氧化能力有显著的抑制效果。与对照组相比, 高糖组 T-SOD 和 CAT 活性显著降低, 说明高糖饮食降低了雄蝇清除氧自由基的能力; MDA 含量极显著增加, 说明雄蝇抗脂质过氧化反应的能力降低。高糖组 T-SOD 活性由 32.72 U/mg prot 降低到 27.31 U/mg prot, 活性为对照组的 83.47% (图 5a,

$p < 0.001$); CAT 活性由 8.72 U/mg prot 降低到 6.93 U/mg prot, 活性为对照组的 79.47% (图 5b, $p < 0.01$); MDA 含量由 13.33 nmol/mg prot 增加到 20.18 nmol/mg prot, 为对照组含量的 1.51 倍 (图 5c, $p < 0.0001$)。

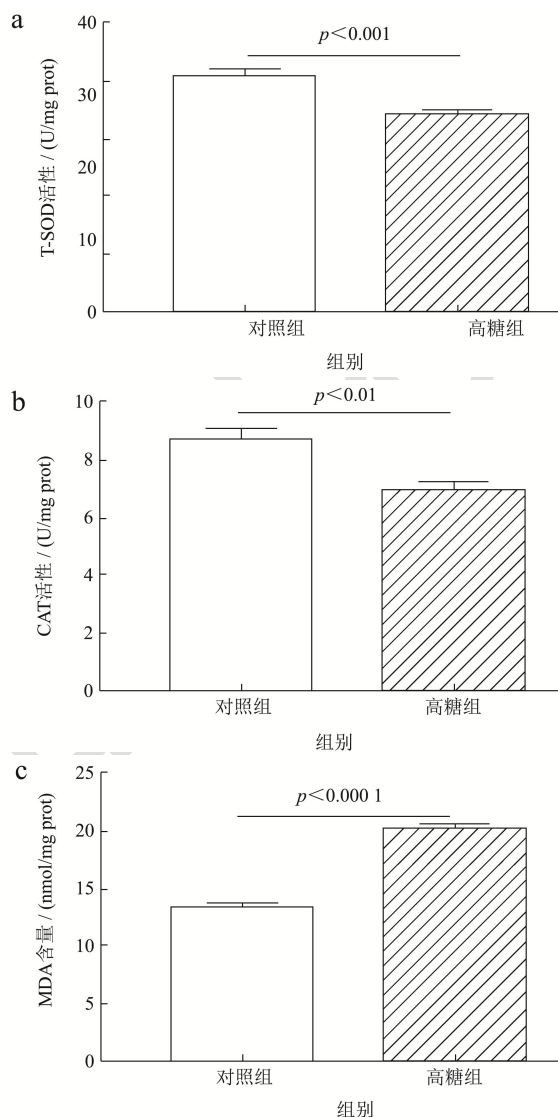


图 5 高糖饮食对雄蝇抗氧化能力的影响

Fig.5 Effect of high-sucrose diet on antioxidant capacity of male flies

2.4 高糖饮食对雄蝇繁殖力的影响

按照表 2 的交配方法, 统计后代的胚胎孵化率。与对照组相比, 高糖组果蝇胚胎孵化率显著降低, 由 88.08% 降低到 70.77%, 说明了高糖饮食损伤了雄蝇的育性。

表 2 雄性果蝇繁殖力实验结果

Table 2 The fertility test of male *D. melanogaster*

组别	交配组(♂×♀)	胚胎孵化率/%	差异显著性
对照组	普通×普通	88.08±0.01	

高糖组 高糖×普通 70.77±0.01 p<0.000 1

2.5 高糖饮食对雄蝇生殖细胞的影响

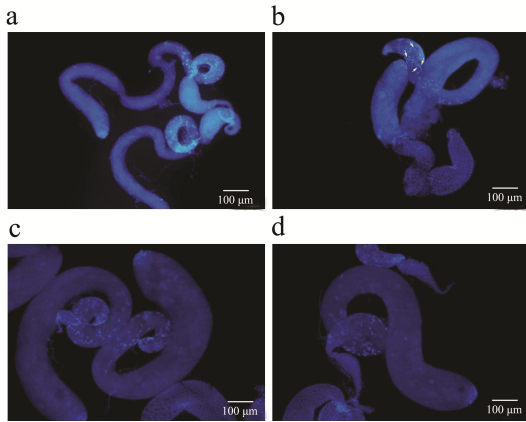


图 6 对照组和高糖组果蝇精巢的 DAPI 染色

Fig.6 DAPI staining of fly testis in control group and high sucrose group

注：比例尺为 100 μm。a、c 分别代表对照组和高糖组对应的精巢总体图，b、d 分别代表对照组和高糖组的精巢储精囊。图 b 中白色箭头指示即为精子束。

为了探明高糖饮食影响雄蝇育性的机理，探究是否影响果蝇精子的发生过程，对雄蝇精巢进行了 DAPI 染色，结果表明，与对照组相比，高糖组果蝇精巢整体膨大异常，精巢末端精子细胞核数量减少（图 6a、6c）；高糖组精巢储精囊中不存在精子束，而对照组储精囊中存在明显的精子束图（图 6b、6d）。

2.6 高糖饮食对雄蝇精巢组织生化成分的影响

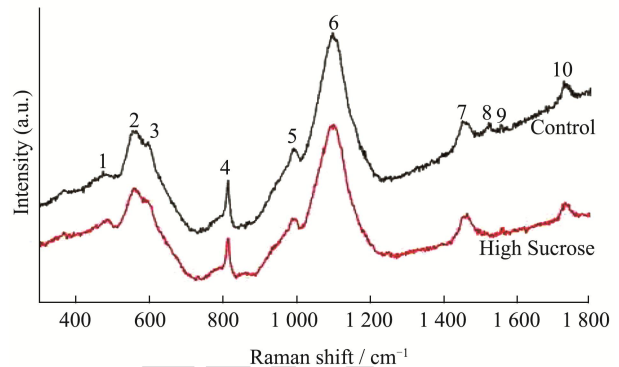


图 7 两组处理后平均拉曼光谱 (200~1 800 cm⁻¹)

Fig.7 Average Raman spectra of the two groups after treatment (200~1 800 cm⁻¹)

表 3 各个拉曼峰位代表的生化成分

Table 3 Biochemical components of Raman peak

峰编号	拉曼峰位/cm ⁻¹	代表的化合物	参考文献
1	481	DNA	[19]
2	573	色氨酸，核酸 (C&G，DNA/RNA 碱基的环状呼吸模式)	[20]
3	596	磷脂酰肌醇	[21]
4	813	胶原蛋白 (C-C 伸缩)，RNA (PO ₂ ⁻)	[22]
5	996	胶原蛋白 (C-O 伸缩)	[23]
6	1 100	DNA，酰胺III，蛋白质 (C-N 伸缩)	[24]
7	1 450	蛋白质，磷脂 (C-H 形变模式)	[25]
8	1 520	类胡萝卜素	[26]
9	1 558	色氨酸，酪氨酸，酰胺II (C-N 伸缩，N-H 弯曲)	[27]
10	1 720	天冬氨酸、谷氨酸 (C=O 拉伸振动)	[28]

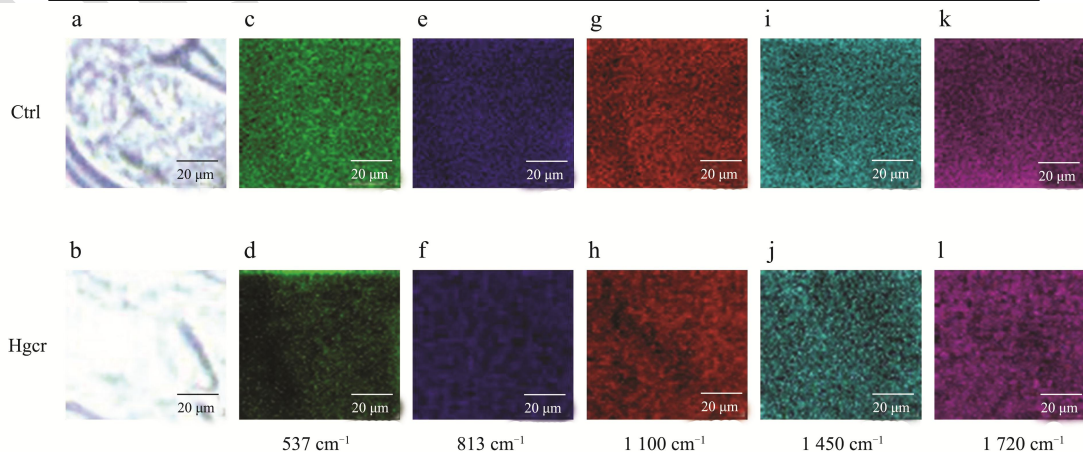


图 8 对照组精巢 (Ctrl) 和高糖组精巢 (Hger) 在 200 μm×200 μm 区域面扫描的拉曼成像

Fig.8 Raman imaging of testis of control group (Ctrl) and high-sucrose group (Hgr) in 200 μm×200 μm region

对果蝇精巢进行平均拉曼光谱扫描，两组的平均拉曼光谱如图 7 所示，可以看出对照组和高糖组出现多个峰值变化，反映出了明显差异。对照组和高糖组峰位信号强度变化的主要峰值在 573、813、996、1 100、1 450、1 520、1 558 和 1 720 cm⁻¹ 处。光谱中拉曼峰所代表的生化成分如表 3 所示。高糖组精巢的拉曼光谱中代表蛋白质条带（1 100、1 450、1 558 和 1 720 cm⁻¹），核酸条带和胶原带（481、573、813 和 996 cm⁻¹）的拉曼峰强度明显低于对照组。通过观察拉曼组织成像，结果发现对照组精巢 573 cm⁻¹（色氨酸、核酸），813 cm⁻¹（胶原蛋白、RNA），1 100 cm⁻¹（DNA、蛋白质），1 450 cm⁻¹（蛋白质、磷脂）和 1 720 cm⁻¹（天冬氨酸、谷氨酸）处的生物成分分布均匀，而高糖组精巢的物质分布不规则（图 8）。

2.7 转录组测序与荧光定量

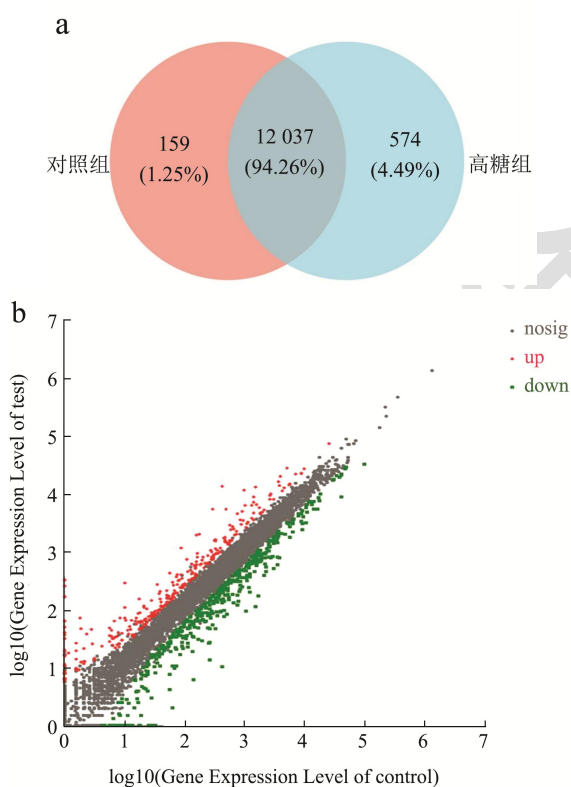


图 9 对照组和高糖组雄蝇基因表达差异图

Fig.9 Differences in gene expression between male flies in the control group and the high-sucrose group

注：a 为对照组和高糖组雄蝇基因表达量的韦恩图；b 为对照组和高糖组果蝇表达量差异基因的散点图。

利用 Illumina 测序平台对对照组和高糖组雄蝇进行测序，筛选出表达量大于 1 的基因，可以发现对照组雄蝇特有 159 个基因，高糖组雄蝇特有 574 个基因，两组共有基因为 12 037 个（图 9a）。采用 edgeR 差异

分析软件筛选出差异表达量基因，筛选阈值为：差异倍数|log2FC|≥1 和 p<0.05，并对每个基因进行多次检测和分析。结果表明，对照组与高糖组雄蝇差异表达基因共 739 个（图 9b）。随后，通过 GO 功能注释分析比较基因的功能，发现这些差异表达基因参与生物学过程、分子功能和细胞组分。在生物学过程分类中，245 个基因参与代谢过程、89 个基因参与应激反应、50 个基因参与发育过程、29 个基因参与繁殖过程、12 个基因与昆虫行为相关（图 10）。GO 富集分析差异表达基因主要具有哪些功能，结果表明差异表达基因主要涉及氧化还原过程和氧化还原酶活性（图 11）。进一步，通过荧光定量 PCR 验证了部分差异基因的表达量（表 4），结果与转录组测序一致（图 12）。与糖代谢相关的基因 *Pepck1* 和谷胱甘肽合成相关的基因 *GstD2* 表达上调，与成虫寿命相关的基因 *mthl2*、参与凋亡细胞清除的基因 *NimC4*、与早期胚胎信号转导相关的基因 *vkg*、参与雄性求偶行为的基因 *CheB42a* 表达下调。

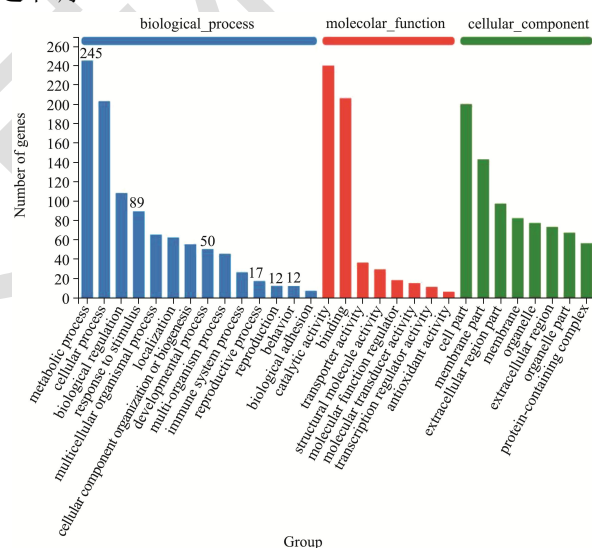


图 10 对照组和高糖组果蝇差异基因的 GO 功能注释分类统计图

Fig.10 Statistical diagram of GO functional annotation classification of differential expression genes in flies

表 4 荧光定量验证的基因

Table 4 Genes verified by fluorescence quantification

基因名称	表达类型	差异表达倍数
<i>Pepck1</i>	上调	2.72
<i>GstD2</i>	上调	2.52
<i>mthl2</i>	下调	-5.36
<i>NimC4</i>	下调	-3.05
<i>vkg</i>	下调	-2.38
<i>CheB42a</i>	下调	-4.09

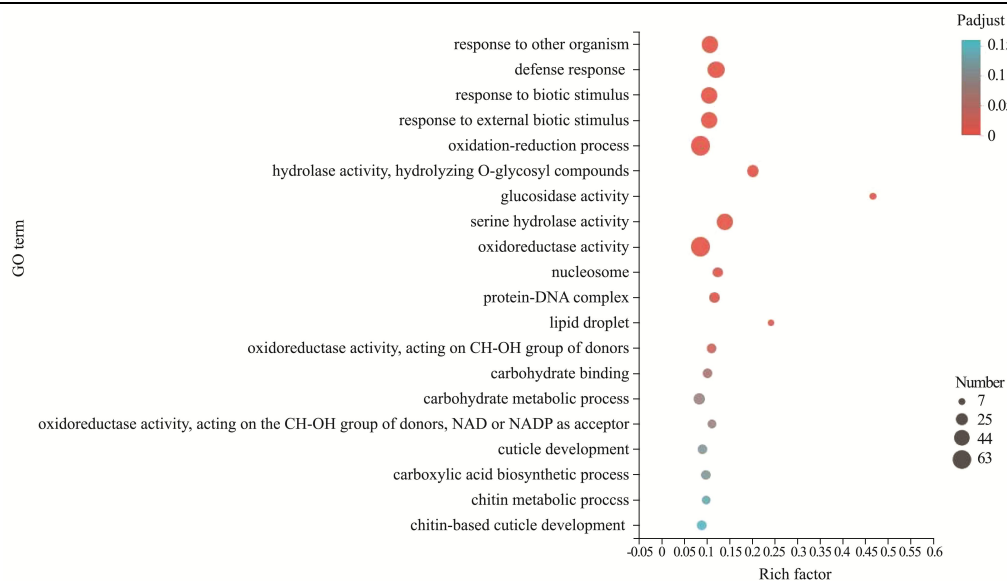


图 11 对照组和高糖组果蝇差异基因的 GO 富集分析图

Fig.11 GO enrichment analysis of differential expression genes

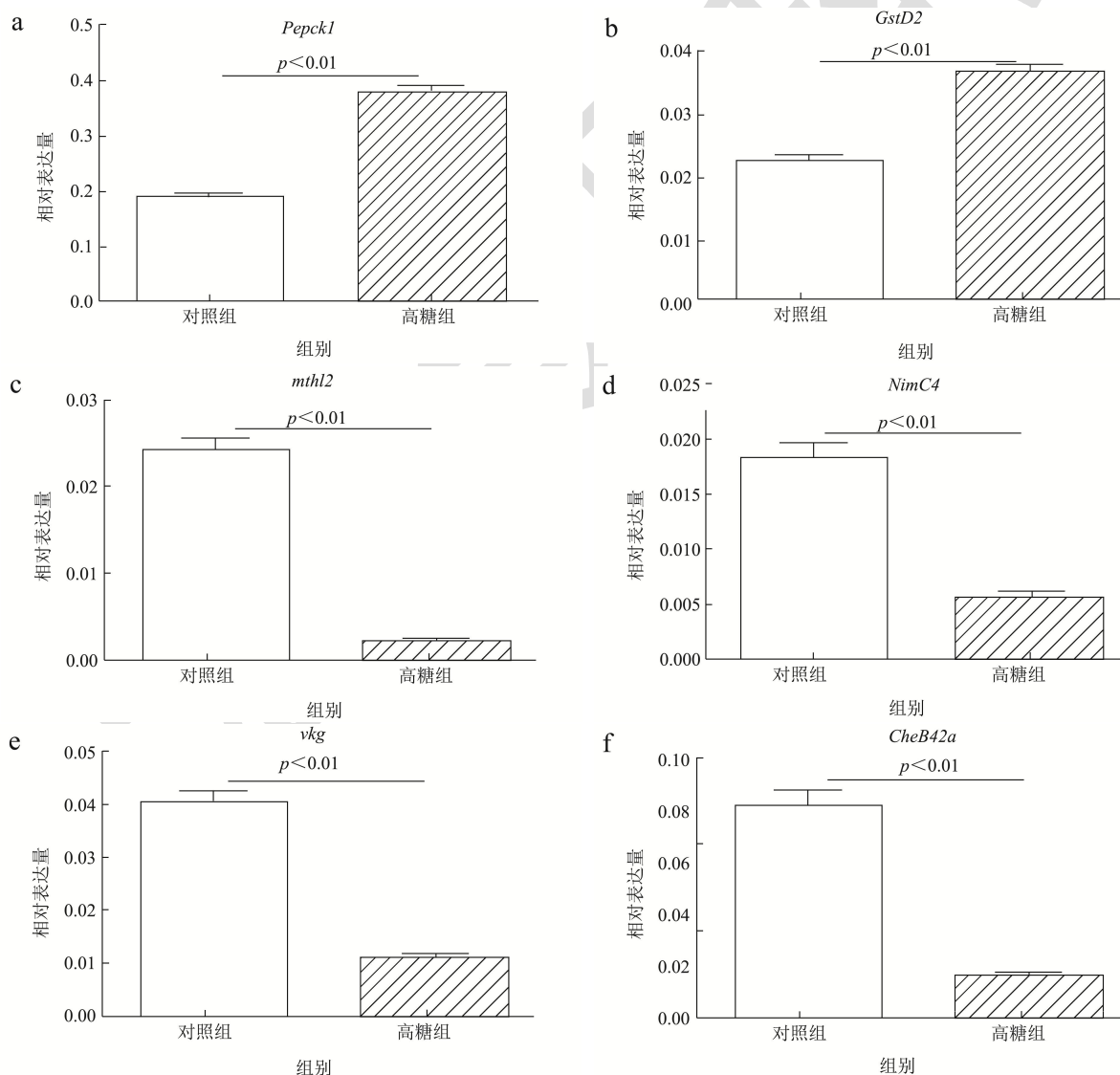


图 12 对照组和高糖组果蝇差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig.12 qRT-PCR validation of differential expression genes in flies

3 讨论

本实验研究结果表明,高含糖饮食会造成后代雄性果蝇寿命、运动能力、抗氧化能力和生育能力降低。胚胎孵化率统计结果表明,高糖组果蝇的胚胎孵化率降低,说明高糖饮食对雄蝇的育性产生了不利影响。有研究发现,氧化应激可能在糖尿病及其诱发相关男性生殖功能障碍和异常的病理生理学中都起重要作用^[29]。因此,高糖饮食诱导雄蝇抗氧化能力损伤,可能是导致雄蝇生育能力降低的原因之一,这些改变会影响睾丸细胞的糖代谢^[30,31]。此外,精子的细胞膜由大量的不饱和脂肪酸构成,容易被氧化(脂质过氧化);另一方面,细胞质中含有的能够中和 ROS 的酶又很少量,所以精子特别容易受到 ROS 的破坏作用^[32]。

为了进一步探究影响雄性育性的机理,我们通过 DAPI 精核染色发现,高糖饮食组果蝇精巢整体膨大异常,储精囊中没有明显的精子束。在大鼠中的研究也有相似结果,与正常组大鼠附睾组织形态结构相比,高脂高糖组附睾结构受损,管腔内精子数目极少^[33]。激光显微共焦拉曼成像结果与生物学测定结果一致,高糖组精巢的拉曼光谱中代表蛋白质条带(1 100、1 450、1 558 和 1 720 cm^{-1}),核酸条带和胶原带(481、573、813 和 996 cm^{-1})的拉曼峰强度明显低于对照组。在 1 520 cm^{-1} 代表的类胡萝卜素处,对照组的拉曼峰强度明显高于高糖组。而类胡萝卜素在抗氧化方面具有重要的功效,不仅能直接作为抗氧化剂来清除自由基,还能增加体内 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和 CAT 等抗氧化酶的含量,进而强化机体自身的抗氧化能力^[34],进一步联系了氧化损伤与生育力的关系。

转录组测序及荧光定量验证结果表明,与糖代谢相关的基因 *Pepck1* 和谷胱甘肽合成相关的基因 *GstD2* 出现了表达上调,说明高糖组果蝇可能是由于糖代谢异常和氧化应激异常导致果蝇发育和育性受到影响。同时,我们也发现了与成虫寿命相关的基因 *mthl2*、参与凋亡细胞清除的基因 *NimC4* 表达量出现下调,进一步解释了高糖饮食导致雄蝇寿命缩短的原因。Park 等研究发现 *CheB42a* 突变雄性果蝇比对照组雄性果蝇更早、更频繁地尝试与雌性交配,表明 *CheB42a* 能调节雄性的求偶行为^[35]。同样地,本研究中与早期胚胎信号转导相关的基因 *vkg*、参与雄性求偶行为的基因 *CheB42a* 表达量也出现了下调,说明这些基因可能影响着果蝇的育性。

4 结论

综上,高糖饮食抑制了雄性黑腹果蝇发育,同时对果蝇的生育能力造成了损伤,DAPI 精核染色和共焦拉曼光谱均说明了高糖饮食对精巢造成了损伤。通过转录组测序,我们发现高糖组果蝇的差异表达基因富集在果蝇发育过程、机体代谢活动调控及应激反应等方面,从而缩短果蝇寿命和损伤果蝇育性。

参考文献

- [1] Kiran N, Prizment A E, Lazovich D, et al. Sucrose intakes and incident colorectal cancer risk among women [J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2020: 1-7
- [2] Xi Y, Lin Q, Yang Q, et al. Association between free sugars intake and excessive daytime sleepiness among Chinese adolescents [J]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 3959
- [3] Sánchez-Solís C N, Cuevas Romero E, Soto-Rodríguez I, et al. High-sucrose diet potentiates hyperaldosteronism and renal injury induced by stress in young adult rats [J]. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 2020, 47(12): 1985-1994
- [4] Stanhope K L, Schwarz J Marc, Havel P J. Adverse metabolic effects of dietary fructose: results from the recent epidemiological, clinical, and mechanistic studies [J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2013, 24(3): 198-206
- [5] Jamar G, Ribeiro D A, Pisani L P. High-fat or high-sugar diets as trigger inflammation in the microbiota-gut-brain axis [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 2: 1-19
- [6] 文明明,赵治恒,毕洁,等.高糖饮食对果蝇发育和抗氧化能力的影响及其机理研究[J].*食品工业科技*,2021,42(21):377-384
- [7] Ku H H, Brunk U T, Sohal R S. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1993, 15(6): 621-627
- [8] Gallo A, Esposito M C, Tosti E, et al. Sperm motility, oxidative status, and mitochondrial activity: exploring correlation in different species [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(7): 1131
- [9] Shafer O T, Keene A C. The regulation of *Drosophila* sleep [J]. *Current Biology*, 2021, 31(1): R38-R49
- [10] Macartney E L, Zeender V, Meena A, et al. Sperm depletion

- in relation to developmental nutrition and genotype in *Drosophila melanogaster* [J]. *Evolution*, 2021, 75(11): 2830-2841
- [11] Zheng Y, Bi J, Hou MY, et al. *Ocnus* is essential for male germ cell development in *Drosophila melanogaster* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27(5): 545-555
- [12] Wu C H, Zong Q, Du A L, et al. Knockdown of *Dynamitin* in testes significantly decreased male fertility in *Drosophila melanogaster* [J]. *Developmental Biology*, 2016, 420(1): 79-89
- [13] Maria P, Ashton K M, Stringfellow H F, et al. Raman spectroscopic techniques to detect ovarian cancer biomarkers in blood plasma [J]. *Talanta*, 2018: 189
- [14] 王艳, 崔子健, 王燕, 等. 基于表面增强拉曼光谱检测技术的肺癌早期诊断研究[J]. *光散射学报*, 2013, 25(1): 35-41
- [15] 吴海宁. 基于拉曼光谱的生物组织成像研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2020
- [16] 吴春红. *Dynamitin* 调控雄性果蝇生殖和幼虫发育的机制研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2017
- [17] 张晓月. 高糖饮食对果蝇肠道干细胞增殖及分化的影响[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018
- [18] 怀雪, 孟永海, 王艳艳, 等. 刺玫瑰提取物抗衰老作用的研究[J]. *食品科技*, 2019, 44(2): 215-220
- [19] Binoy J, Abraham J P, Joe I H, et al. NIR-FT Raman and FT-IR spectral studies and ab initio calculations of the anti-cancer drug combretastatin-A4 [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2015, 35(11): 939-946
- [20] Stone N, Kendall C, Smith J, et al. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers [J]. *Faraday Discussions*, 2004, 126: 141
- [21] Krafft C, Neudert L, Simat T, et al. Near infrared Raman spectra of human brain lipids [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2005, 61(7): 1529-1535
- [22] Ruiz-Chica A J, Medina M A, Sánchez-Jiménez F, et al. Characterization by Raman spectroscopy of conformational changes on guanine-cytosine and adenine-thymine oligonucleotides induced by aminoxy analogues of spermidine [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2010, 35(2): 93-100
- [23] 朱智慧, 孟凡皓, 夏嘉斌, 等. 拉曼光谱技术在口腔癌诊断中的研究进展[J]. *中国医学科学院学报*, 2020, 42(3): 399-404
- [24] Shetty G, Kendall C, Shepherd N, et al. Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus [J]. *British Journal of Cancer*, 2006, 94(10): 1460-1464
- [25] Bonnier F, Byrne H J. Understanding the molecular information contained in principal component analysis of vibrational spectra of biological systems [J]. *Analyst*, 2012, 137(2): 322-332
- [26] Stone N, Kendall C, Smith J, et al. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers [J]. *Faraday Discussions*, 2004, 126: 141
- [27] Katainen E, Elomaa M, Laakkonen U M, et al. Quantification of the amphetamine content in seized street samples by Raman spectroscopy [J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2007, 52(1): 88-92
- [28] Kendall C, Hutchings J, Barr H, et al. Exploiting the diagnostic potential of biomolecular fingerprinting with vibrational spectroscopy [J]. *Faraday Discuss*, 2011, 149: 279-356
- [29] Pereira S C, Oliveira P F, Oliveira S R, et al. Impact of environmental and lifestyle use of chromium on male fertility: focus on antioxidant activity and oxidative stress [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(9): 1365
- [30] Lotfi F, Ziamajidi N, Abbasalipourkabir R, et al. Impacts of garlic extract on testicular oxidative stress and sperm characteristics in type 1 and 2 diabetic rats: An experimental study [J]. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 2021, 19(10): 929-942
- [31] Gorga A, Rindone G M, Regueira M, et al. PPAR γ activation regulates lipid droplet formation and lactate production in rat Sertoli cells [J]. *Cell & Tissue Research*, 2017, 369: 611-624
- [32] Aitken R J. DNA damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in the offspring [J]. *Aitken Robert John*, 2017, 6: S761-S764
- [33] 张欣, 马小茹, 薛晶文, 等. 灵芝孢子保护糖尿病模型大鼠附睾及对自噬的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(29): 4632-4637
- [34] Jung B, Darvin M E, Jung S, et al. Kinetics of the carotenoid concentration degradation of smoothies and their influence on the antioxidant status of the human skin *in vivo* during 8 weeks of daily consumption [J]. *Nutrition Research*, 2020, 81: 38-46
- [35] Park S K, Mann K J, Lin H, et al. A *Drosophila* protein specific to pheromone-sensing gustatory hairs delays males' copulation attempts [J]. *Current Biology*, 2006, 16(11): 1154-1159