

## 【药效学评价】

## 羊栖菜多糖促进生育相关基因表达提高果蝇生育力的研究

张亚<sup>1</sup>, 赵子慧<sup>1</sup>, 张旭<sup>1,2</sup>, 陈柳君<sup>1</sup>, 吴明江<sup>1,2</sup>, 陈培超<sup>1,2\*</sup>

1. 温州大学生命与环境科学学院, 浙江 温州 325035

2. 浙江省水环境与海洋生物资源保护重点实验室, 浙江 温州 325035

**摘要:** 目的 研究羊栖菜多糖(SFPS)对亲本果蝇生育能力的影响及其作用机制。方法 采用85℃热水煮提、乙醇沉淀、氯化钙去除褐藻胶等多种工序提取SFPS;以黑腹果蝇为模式生物,分别以对照(0%)、低(0.033%)、中(0.167%)、高(0.500%) 4个浓度持续喂食15 d,通过检测子代数量、体质量、每天羽化量评估不同浓度SFPS对果蝇生育能力的影响;荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测亲本果蝇生育和发育相关基因Vasa、Achi、Figla和子代果蝇mTOR的表达。结果 与对照组比较,喂食SFPS能显著性地提高雌蝇和雄蝇的生育力,并且对其子代果蝇体质量、羽化率和雌雄比例也有后续的促进作用,低和中浓度SFPS分别对母本和父本果蝇的生育力促进效果最优;持续喂食SFPS后,亲本果蝇生殖发育相关基因在mRNA水平上显著提高;亲本喂食低、高浓度SFPS后,子代果蝇mTOR表达水平普遍升高,子代雌蝇变化更为显著。结论 SFPS通过调控果蝇生育相关基因的表达,提高亲本果蝇的生育能力,对子代果蝇的生长发育也有显著促进作用。

**关键词:** 羊栖菜多糖;黑腹果蝇;生育力;荧光定量PCR;Vasa;Achi;Figla;mTOR

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)06-0925-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.06.003

## Promotion of *Sargassum fusiforme* polysaccharides on fertility of *Drosophila melanogaster* by upregulating expression of fertility related genes

ZHANG Ya<sup>1</sup>, ZHAO Zi-hui<sup>1</sup>, ZHANG Xu<sup>1,2</sup>, CHEN Liu-jun<sup>1</sup>, WU Ming-jiang<sup>1,2</sup>, CHEN Pei-chao<sup>1,2</sup>

1. College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China

2. Zhejiang key lab of water environmental and marine bio-resources protection, Wenzhou 325035, China

**Abstract:** **Objective** To estimate effects and possible underlying mechanisms of *Sargassum fusiforme* polysaccharides (SFPS) on fertility and reproduction, which were oral administered to *Drosophila melanogaster*. **Methods** SFPS applied in the following experiments was extracted using 85 °C hot boiled extraction, purified by ethanol precipitation, and removed alginates by calcium chloride. *D. melanogaster* were applied as model and fed with four kinds of concentration of SFPS namely control (0%), low (0.033%), medium (0.167%), and high (0.500%), for 15 d. Effects of SFPS on fertility were assessed by detecting the number of offspring, body weight, and daily eclosion. Meanwhile, we also determined the expression patterns of fertility and development related genes, such as Vasa, Achi, Figla (parental generation), and mTOR (filial generation) in different SFPS concentration groups. **Results** Compared with control group, fertility of flies was significantly enhanced by feeding with SFPS. Moreover, effect on fertility also further facilitates weights, eclosion rates, and gender ratios of offspring flies. However, fertility of father and mother flies performed different dose dependent patterns, and performed best by feeding with low and medium doses of SFPS respectively. The fertility and development related genes mRNA level significantly increased after continuous feeding with SFPS. After parental feeding of low and high concentration of SFPS, mTOR expression level of offspring increased significantly, female offspring changed more significantly.

收稿日期: 2016-06-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31470430; 31200266); 国家星火计划重点项目(2015GA700005); 浙江省公益性应用研究计划(2017C32103); 温州市公益性农业科技项目(N20150034); 浙江省新苗人才计划(KZS1512066)

作者简介: 张亚(1990—),女,河北邯郸人,硕士生,研究方向为羊栖菜多糖活性研究。E-mail: m18267786076@163.com

\*通信作者 陈培超(1985—),男,博士,硕士生导师,研究方向为海洋药物资源研究。E-mail: chenpeichao@wzu.edu.cn

**Conclusion** SFPS promotes fertility of *D. melanogaster*, and which may through upregulating the expression patterns of fertility related genes. Meanwhile, SFPS also obviously promotes development of offspring, when parents are feeding with SFPS.

**Key words:** *Sargassum fusiforme* polysaccharides; *Drosophila melanogaster*, fertility; qRT-PCR; Vasa; Achi; Figla; mTOR

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch 是一种营养丰富的药食两用海藻, 享有“长寿菜”的美誉, 隶属于褐藻门马尾藻科马尾藻属, 广泛分布在西太平洋沿海, 尤以浙江沿海分布最多。中国药典古籍中早有记载羊栖菜用于治疗甲状腺相关疾病, 现代医学研究进一步表明, 羊栖菜不仅是一种非常有潜力的天然抗氧化剂, 而且对治疗肿瘤、心血管疾病、降低血糖和延缓衰老等都有一定的效果<sup>[1-2]</sup>。日本已有羊栖菜相关的饮品和保健品的开发和销售, 其主要成分为羊栖菜多糖 (*Sargassum fusiforme* polysaccharides, SFPS)。然而, SFPS 保健作用的分子机制仍不清晰, 是否存在副作用也未有详细评估。

SFPS 主要成分为褐藻糖胶、褐藻胶和褐藻淀粉, 而羊栖菜的许多生物活性, 如抗氧化<sup>[3-5]</sup>, 抗肿瘤和调节免疫<sup>[6-7]</sup>等与褐藻糖胶密切相关。目前, SFPS 提取工艺比较成熟<sup>[8-9]</sup>, 纯化分级得到进一步完善, 然而, 不同的提取和纯化工艺所得到的 SFPS 的成分组成存在较大的差异。本实验室采用 85 °C 热水煮提、乙醇沉淀、氯化钙去除褐藻胶等多种工序提取得到一组 SFPS。前期研究表明, SFPS 具有很强的抗氧化和抗衰老作用<sup>[4]</sup>。但是, 部分抗氧化与抗衰老药物对成熟个体生育能力有一定的副作用<sup>[10-11]</sup>, 因此, 本实验通过喂食亲本黑腹果蝇不同浓度的 SFPS, 评估 SFPS 是否影响成熟个体的生育能力并探讨其可能的分子机制。

本研究以黑腹果蝇为模式生物, 对照 (0%)、低 (0.033%)、中 (0.167%)、高 (0.500%) 4 个浓度梯度的 SFPS 分别喂食亲本雌雄蝇, 持续 15 d 后交配, 评估前期 SFPS 处理后, 对亲本雌雄蝇生育能力以及子代果蝇的生长发育的影响。并进一步利用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测果蝇生殖与发育相关基因 Vasa<sup>[12]</sup>、Achi<sup>[13]</sup>、Figla<sup>[14]</sup>和 mTOR<sup>[15]</sup>的 mRNA 水平的变化情况, 以确定 SFPS 对果蝇生殖与发育影响的可能机制。

## 1 材料

### 1.1 药材、提取工艺及主要试剂

羊栖菜, 采自浙江省温州市洞头沿海海岸, 经浙江省温州市羊栖菜研究所吴明江教授鉴定为马尾藻属羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch。

采摘新鲜羊栖菜, 烘干至恒重, 粉碎, 筛网过滤, 除去未粉碎杂质。称取粉末 500 g, 加入无水乙醇, 水浴回流提取 3 次, 每次 2 h。收集滤渣, 加入 15 L 蒸馏水加热蒸煮 3 遍, 分别为 4、3、2 h。两层纱布滤过, 收集滤液 65 °C 旋蒸浓缩各至 5 L, 离心收集上清液, 继续浓缩至总量为 3 L。浓缩液加入无水乙醇至浓度为 80%, 醇沉过夜。收集上清液, 4 800 r/min 离心 10 min。收集上清液, 加入 4 mol/L 氯化钙至不再产生沉淀, 离心取上清液, 80% 乙醇醇沉过夜, 取沉淀常规干燥, 真空干燥, 得到 SFPS<sup>[16]</sup>。

从 500 g 羊栖菜粉末中提取 SFPS, 其主要成分为褐藻糖胶, 干燥后净重 27.81 g, 得率为 5.56%, 总糖质量分数为 83.21%, 糖醛酸及蛋白质的质量分数均较低, 分别为 3.67% 和 3.45%, 表明 SFPS 为酸性多糖, 多糖中的蛋白质可能不是游离蛋白质, 而是与多糖结合的糖蛋白<sup>[17]</sup>。这些多糖性质分析表明 SFPS 的纯度较高。

玉米-糖-酵母基本培养基、琼脂、氯化钙、氯化钠、氯化钾、无水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、异丙醇、氯仿, 均购自国药集团化学试剂有限公司; 蔗糖、丙酸 (西陇化工股份有限公司); 酵母浸出粉、干酵母粉 (上海蓝季科技发展有限公司); 乙醇 (安徽安特食品股份有限公司); Trizol® Reagent (美国 ambion 公司); HiScript® QRT Super Mix for qPCR、RNase Free DNase 酶 (中国南京诺唯赞生物科技有限公司); SYBR Green II (日本大阪 Toyobo 公司)。

### 1.2 实验动物

野生型黑腹果蝇, 由温州大学生命与环境科学学院遗传学实验室提供, 收集 8 h 内羽化未交配的成虫, 雌雄分开, 在温度为 (25±1) °C, 相对湿度为 45%~65% 的条件下普通培养基饲养备用。

### 1.3 主要仪器

1525 高效液相色谱仪, 包括 2487 紫外检测器、717plus 自动进样器及 Breeze 工作站, 购自英国 Waters 科技有限公司; MS105DU 电子天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司); HH-2 数显恒温水浴锅 (江阴市保利科研器械有限公司); Milli-Q 超纯水仪 (德国 Millipore 公司); HWS 智能型恒温恒湿培养箱 (宁波江南仪器厂); 挑蝇板、果蝇管 (海门

市健力实验器材厂); 洁净工作台(苏净集团安泰空气技术有限公司), Applied Biosystems Veriti PCR 仪、LightCycler 480 II (瑞士 Roche 公司)。

## 2 方法

### 2.1 对黑腹果蝇繁殖力的影响

收集 8 h 内羽化的果蝇, CO<sub>2</sub> 麻醉后区分雌雄, 随机分为 8 组(雌蝇 4 组、雄蝇 4 组), 每组 100 只, 分别放在含有 0.0% (对照组)、0.033%、0.167% 和 0.500% 热提 SFPS 的培养基中饲养。15 d 后每组各取 30 只, 每 10 只为一小组, 共 3 组, 与普通雌雄蝇配对。转入普通培养基使其受精产子, 待子代果蝇 (F1 代) 开始孵化时, 每 24 h 观察并记录羽化子代数, 培养 3 d 后, 体视显微镜观察体型变化, 分析天平称取体质量(每 15 只果蝇为一组)变化<sup>[17]</sup>。

### 2.2 基因序列与引物设计

鉴于果蝇发育相关基因的重要性, 根据昆虫发育过程中相关基因的上下游关系、相互作用方式以及功能特点确定, 研究的基因中包括生殖细胞分子标记基因 *Vasa*, 调控卵细胞发育成熟转录因子 *Figla*, 雄性减数分裂阻滞基因 *Achi*, 调控生长发育相关基因 *mTOR* 以及内参基因 *RP49*<sup>[18]</sup>。引物序列(表 3), 由深圳华大基因科技服务有限公司合成。

表 1 基因及其特异引物

Table 1 Genes and specific primers

基因	引物序列 (5'-3')
Vasa	正向引物 ACGAGTGCATTACCAGAGGC
	反向引物 ATGCCAATGGCGACGAAAAC
Achi	正向引物 CACTTCGGCTGGCAATAATC
	反向引物 ACCTCGTCCGCCTGTAGATT
FIGLA	正向引物 CCTATTTCGCCAACGCCATG
	反向引物 GTTGTCTCGTCTCCATTTG
mTOR	正向引物 GCAGTTGTTTGTAGGCGGAG
	反向引物 TGGTCGTACATTGCTGCTG
RP49	正向引物 CCCTCTTCCAGCCATCGTTC
	反向引物 CCACCGATCCAGACGGAGTA

### 2.3 RNA 提取和 cDNA 合成

收集多糖处理 15 d 后亲代果蝇及 F1 子代果蝇, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 并用 RNase Free DNase 酶消化残留的基因组 DNA。以总 RNA 为模板, 参照 HiScript 反转录试剂盒说明书进行操作将 mRNA 反转录为 cDNA, 并保存于 -20 °C 备用。

### 2.4 qRT-PCR 实验

以 cDNA 为模板, 分别以各基因特异引物进行 PCR 扩增。利用 Rotor-Gene 荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR, 反应体系按 SYBR Green II 说明书进行, 正向和反向引物各 1 μL, 最终反应体系为 20 μL, *RP49* 为内参基因。利用溶解曲线分析引物的特异性扩增, 每组 3 次重复。试验得到的数据用 LinRegPCR 和 Rotor-Gene 软件计算, 并利用相对定量分析法进行分析。

### 2.5 数据处理

实验数据采用 SPSS 16.0 和 Prism 5 软件处理, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组均数间差异采用 *LSD-t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 对雌性果蝇繁殖能力及子代生长发育的影响

与对照组比较, 随着亲代雌蝇饲喂 SFPS 浓度的增加, 低、中浓度组的子代雌雄果蝇数量显著增多 ( $P < 0.05$ ), 但高浓度 SFPS 处理后, 子代雌雄果蝇的数量明显下降 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

研究发现, 子代果蝇体质量也与母本喂食 SFPS 的浓度密切相关。与对照组比较, SFPS 处理后的雌性果蝇子代的体质量呈明显上升趋势 ( $P < 0.05$ ), 低、中浓度 SFPS 对子代体质量增加综合表现较优。中浓度组雌性后代平均体质量高达  $(9.60 \pm 1.09)$  mg, 与对应的对照组比较增加近 27.5%; 而雄性后代则在低浓度 (0.033%) 组中体质量增加最大, 约 19%, 与对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

通过观察子代果蝇每天的羽化量, 探讨母本果蝇被不同浓度 SFPS 处理后, 其子代果蝇的生长发育

表 2 SFPS 对雌蝇子代数目的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of SFPS on offspring quantity of female *D. melanogaster* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/%	雌性/只	雄性/只	雌雄比例	总计
对照	0	97.00 ± 4.58	89.67 ± 7.57	1.09 ± 0.14	186.67 ± 5.69
SFPS	0.033	131.83 ± 8.89*	113.33 ± 5.51*	1.16 ± 0.05	245.17 ± 13.77*
	0.167	126.33 ± 9.45*	102.83 ± 16.00*	1.26 ± 0.15*	229.17 ± 7.69*
	0.500	81.66 ± 2.52*	70.83 ± 10.13*	1.17 ± 0.19	152.50 ± 9.53*

与对照组比较: \* $P < 0.05$ , 下同

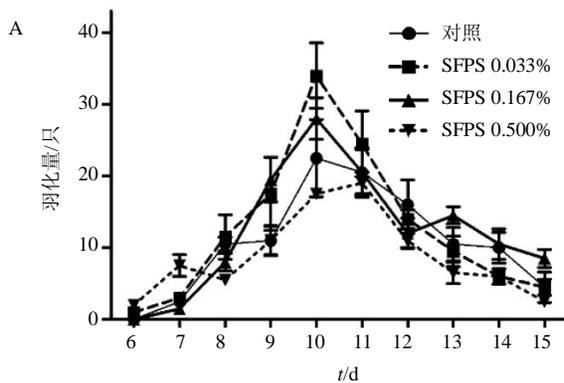
\* $P < 0.05$  vs control group, same as below

是否受到影响。研究表明,前 3 天 0.033% 和 0.167% SFPS 组每天羽化量与对照组较一致,随后每天羽化量都有所增加,第 10 天达到最高值,其中 0.033% 组表现最优,0.167% 组次之,而 0.500% 组与对照组比较,每天羽化量相对较少。母本果蝇喂食 SFPS 后,其子代平均的羽化时间约为 10.9 d,与对照组(10.9 d)

表 3 SFPS 对雌蝇子代体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of SFPS on offspring weight of female *D. melanogaster* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/%	雌性体质量/mg	雄性体质量/mg
对照	0	7.53±0.42	6.04±0.74
SFPS	0.033	9.19±0.82*	7.19±0.82*
	0.167	9.60±1.09*	6.46±0.95
	0.500	8.92±1.21*	7.12±0.84*



比较未出现显著性差异。见图 1。

尽管与对照组比较未出现显著性差异,但 SFPS 处理后的雄性子代的平均羽化时间都略大于平均水平,约为 11.4 d。考虑到 SFPS 对于后代雌雄果蝇数量的影响可能会导致羽化时间的变化,于是本研究进一步分析了 SFPS 处理母本果蝇后,其子代的雌雄比例。雌雄比例随着母本果蝇喂食 SFPS 后都呈现不同程度增加,而中浓度 SFPS 处理后子代果蝇的雌雄比例高达 (1.26±0.19),与对照组比较具有极显著差异 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

综上所述,喂食低、中浓度的 SFPS 可以有效地提高母本果蝇的生育能力,并且与对照组的子代果蝇比较,喂食低、中浓度 SFPS 母本果蝇后,能有效地促进子代后续的生长和发育。

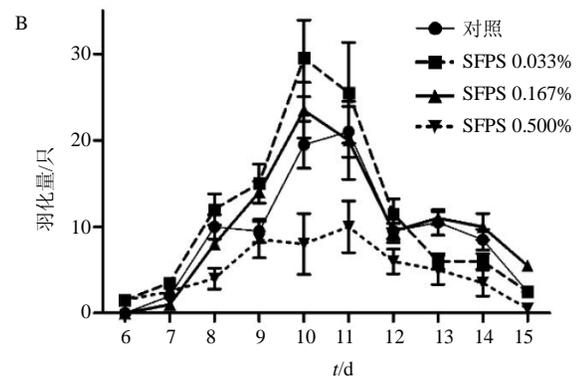


图 1 SFPS 喂食果蝇后, F1 代雌蝇幼虫 (A) 以及雄蝇幼虫 (B) 每天羽化量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 When mother flies fed with SFPS, number of everyday eclosion for F1 female (A) and male (B) *D. melanogaster* generation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.2 对雄性果蝇生殖力及其子代生长发育的影响

由表 4 可知,中、高浓度组子代果蝇数量显著增加,并且 0.167% SFPS 组的综合表现最优。与对照组比较,0.167% SFPS 浓度组的子代果蝇数量(表 4)和体质量(表 5)都显著上升 ( $P < 0.05$ )。

与喂食母本果蝇 SFPS 不同的是,0.033% SFPS 父本果蝇喂食组的雌性子代果蝇数量呈下降趋势 ( $P < 0.05$ ),高浓度组却显著增加 ( $P < 0.05$ ),见表

4。与对照组比较,父本果蝇喂食 SFPS 后,其子代果蝇的体质量都明显增加(表 5),其中 0.167% 浓度组变化最为显著,雌性和雄性后代分别为 (9.50±0.99) mg 和 (7.59±0.98) mg,分别比对应的对照组增加近 26.4% 和 25.7%。

本研究也分析了父本果蝇 SFPS 处理后,其子代果蝇每天的羽化量和平均的羽化时间。F1 代果蝇每天羽化量中,雌性果蝇每天羽化量变化相近(图 2A),而雄性果蝇每天羽化量变化浮动较大(图 2B)。

表 4 SFPS 对雄蝇子代数目的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of SFPS on offspring quantity of male *D. melanogaster* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/%	雌性/只	雄性/只	雌雄比例	总计
对照	0	97.00±4.58	89.67±7.57	1.09±0.14	186.67±5.69
SFPS	0.033	84.50±6.73*	91.67±11.68	0.93±0.06*	176.17±18.00
	0.167	114.83±11.09*	110.67±14.29*	1.06±0.14	225.50±5.27*
	0.500	109.00±10.82*	92.17±7.32	1.19±0.17	201.17±10.30*

另外, 研究发现, 子代果蝇的雌雄比例随父本果蝇喂食 SFPS 浓度升高而升高 (表 4)。与母本果蝇喂食 SFPS 后相似, 父本果蝇喂食 SFPS 后, 其子代果蝇的平均羽化时间未受显著影响, 但其雄性子代的平均羽化时间 (11.4 d) 比对照组略有升高。

综上所述, 喂食中、高浓度的 SFPS 可以有效地提高父本果蝇的生育能力并促进其子代果蝇的生长和发育, 而 0.167% 的 SFPS 对父本果蝇的作用效果最优。

表 5 SFPS 对雄蝇子代体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of SFPS on offspring weight of male *D. melanogaster* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/%	雌性体质量/mg	雄性体质量/mg
对照	0	7.53 ± 0.42	6.04 ± 0.74
SFPS	0.033	8.77 ± 0.58*	6.24 ± 0.46
	0.167	9.50 ± 0.99*	7.59 ± 0.98*
	0.500	9.52 ± 0.85*	7.32 ± 0.59*

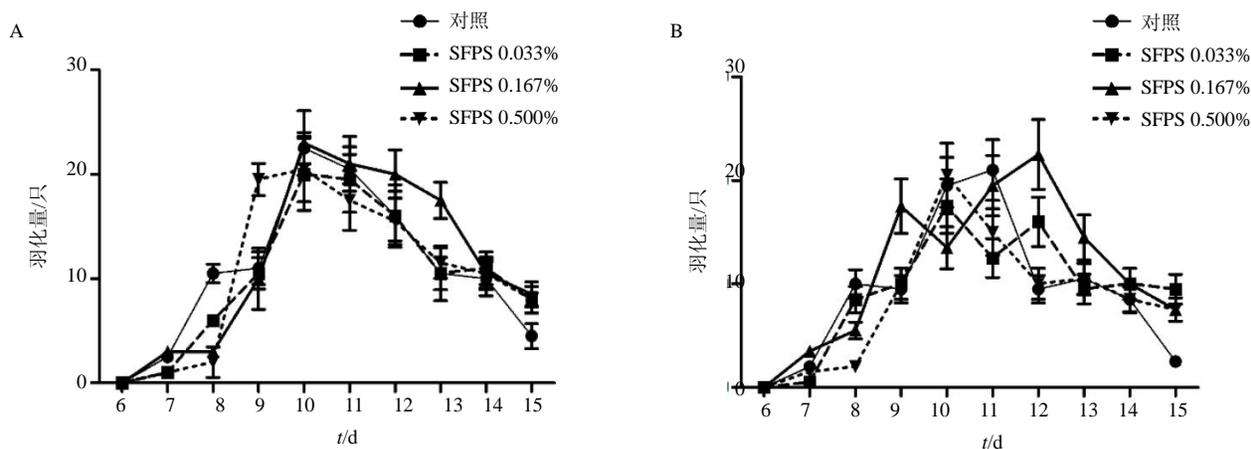


图 2 SFPS 喂食父本果蝇后, F1 代雌蝇幼虫 (A) 以及雄蝇幼虫 (B) 每天羽化量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

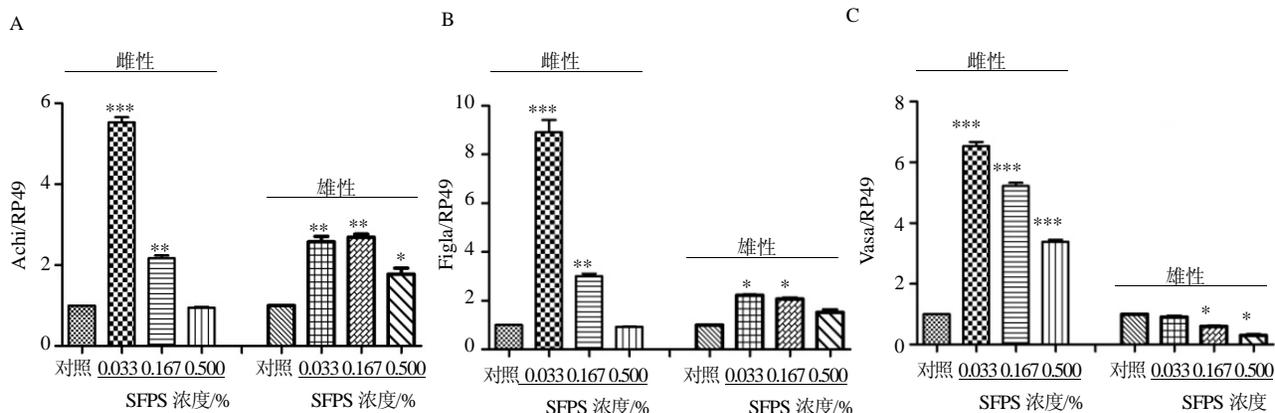
Fig. 2 When father flies fed with SFPS, number of everyday eclosion for F1 female (A) and male (B) *D. melanogaster* generation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.3 对亲代果蝇生殖相关基因的影响

与对照组雄性果蝇比较, SFPS 处理后父本果蝇 Achi 的 mRNA 表达水平显著上升 ( $P < 0.01, 0.001$ ) (图 3A)。当母本果蝇经 SFPS 处理后, 雌蝇 0.033% 组 Achi 的 mRNA 的表达水平比对照组雌性果蝇的

表达水平提高了近 6 倍 ( $P < 0.001$ ), 但需要注意的是, 相对于雄蝇, 雌蝇中 Achi mRNA 的绝对水平很少。

在雌蝇 0.033% 组中, Figla mRNA 的表达水平约是对照组的 9 倍 (图 3B)。而 Vasa 基因, SFPS 处理后在雌雄果蝇中出现了相反的变化。在雌性实



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 下同

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group, same as below

图 3 SFPS 对果蝇生殖发育相关基因 Achi (A)、Figla (B) 和 Vasa (C) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effects of SFPS on reproductive associated genes, Achi (A), Figla (B) and Vasa (C) of *D. melanogaster* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

验组中, SFPS 促进雌蝇 Vasa mRNA 的表达, 低浓度的 SFPS 对雌蝇 Vasa mRNA 的促进作用最显著; 而在雄性实验组中, SFPS 处理后却抑制雄蝇 Vasa 的 mRNA 表达水平 (图 3C)。

综上所述, 研究发现, 持续喂食 SFPS 后, 亲本果蝇中与生殖发育相关基因在 mRNA 水平上显著提高, 这可能是 SFPS 影响亲本生育能力的内在联系。

### 3.4 对子代果蝇生长发育基因 mTOR 的影响

当亲本果蝇持续给予 SFPS 后, 子代果蝇的体型和体质量都发生了显著变化, 本研究检测了 mTOR 基因在各组子代中的表达模式。当亲本喂食 SFPS 后, 大部分子代果蝇中 mTOR 的表达水平显

著升高, 并且 mTOR 在子代雌蝇中比子代雄蝇中升高的更明显。然而, 亲本喂食 SFPS 的剂量与子代中 mTOR 的 mRNA 表达水平变化, 并未表现出一一对应的关系。亲本经 0.033% 和 0.500% 浓度 SFPS 处理后, 其子代果蝇的 mTOR 表达水平显著上升, 然而经 0.167% 浓度组处理后的子代并没有显示出任何变化 (图 4)。在雄性子代中, 高浓度实验组中 mTOR 基因表达上升较为明显, 在 0.167% 浓度组中反而没有变化甚至略微下降趋势 (图 4B)。

综上所述, 当亲本喂食低、高浓度的 SFPS 后, 其子代果蝇的 mTOR 表达水平普遍升高, 子代雌蝇变化更为显著, 雄蝇 mTOR 的转录可能还受到其他信号通路的影响。

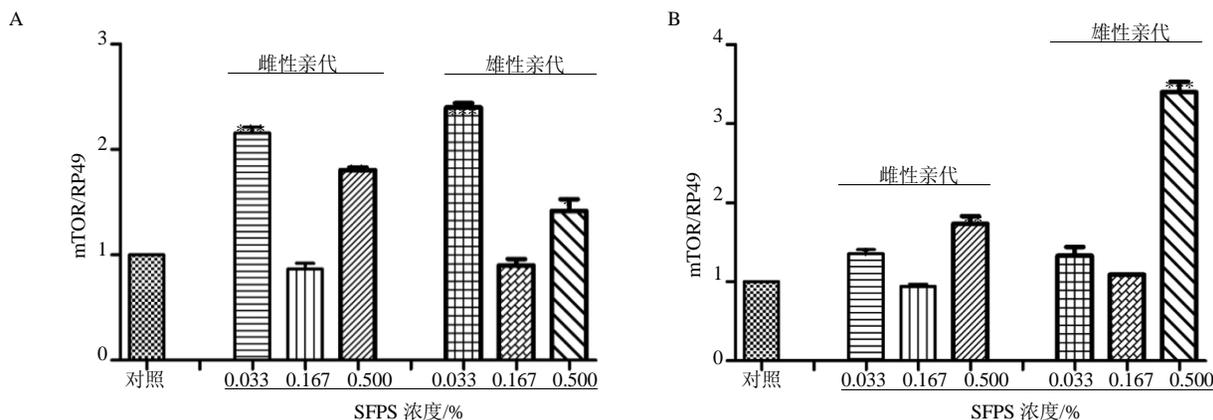


图 4 SFPS 对子代雌性 (A) 和子代雄性 (B) mTOR 基因的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Expression levels of mTOR mRNA in female offspring (A) and male offspring (B), when father and mother flies fed with different doses of SFPS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 4 讨论

羊栖菜是一种药食两用的经济型海藻, 其营养丰富却价格低廉。同时也有研究表明, 羊栖菜也发挥着抗氧化、抗肿瘤、抗炎症、缓解疲劳等功效<sup>[1]</sup>。我国的羊栖菜养殖面积很大, 但主要以低廉价格的干菜形式出口日本。因此, 开发羊栖菜的药用价值既有实际的科学价值, 更具潜在的经济效益。SFPS 是羊栖菜中一类主要的活性成分, 季宇彬等研究发现 SFPS 通过调控 p53 基因表达而发挥抗肿瘤的作用<sup>[20-21]</sup>, 而且 SFPS 的抗氧化活性与其抗肿瘤<sup>[22]</sup>、降血糖活性<sup>[23-24]</sup>密切相关。本课题组前期研究发现, 经疏水树脂分离的水提 SFPS 组分具有清除自由基, 保护小鼠的急性氧化肝损伤的作用<sup>[4, 10]</sup>。但关于 SFPS 的安全性评估和毒理学研究还不清晰, 本实验初步探讨 SFPS 对生育能力的影响。因黑腹果蝇具备遗传背景清晰、基因组与人类基因组保守性高、

生命周期短、繁殖快等优势, 所以利用黑腹果蝇作为模式生物, 通过喂食 SFPS, 评估其对动物生育力及子代生长发育的影响及其可能的分子机制。

喂食 SFPS 能普遍地提高亲本果蝇的生育能力及其子代果蝇的发育状态。然而, SFPS 对雌雄果蝇的影响存在不同的剂量依赖性。在设立的 4 个浓度梯度实验组中, 低浓度 SFPS 对母本果蝇生殖力的促进作用最优, 随着 SFPS 喂食浓度的升高, 母本果蝇的生殖力却逐渐下降 (表 3), 这与其生育相关基因 Achi、Figla 和 Vasa 的表达模式十分吻合 (图 3)。TGIF 家族成员 Achi 是一种减数分裂阻滞基因, 并可调控果蝇生殖细胞发育与成熟过程, 尤其在精子发生与成熟过程中发挥着关键作用; Figla 基因调控卵细胞发育, 是果蝇发育成熟相关的标记之一; 而 Vasa 则是果蝇生殖细胞的标记基因。推测喂食 SFPS 可能直接或间接调控生殖发育相关基因, 如

Achi、Vasa 和 Figla 等的转录水平,影响性腺发育和生殖细胞的成熟,最终影响母本果蝇的生育能力。此外,尽管子代果蝇并不喂食 SFPS,本研究发子代果蝇的个体发育与亲本喂食不同浓度的 SFPS 存在一定的相关性。有研究表明,PI3K/Akt/mTOR 信号通路与个体发育、细胞生长、分化和增殖密切相关<sup>[15]</sup>。当亲本喂食低和高浓度的 SFPS 后,其子代果蝇的 mTOR 表达水平普遍升高,而子代雌蝇变化更为显著。本课题组还发现喂食 SFPS 后,其子代果蝇的雌雄比例也受到显著影响,但相关机制仍不清楚。有研究表明,饮食模式与个体的基因组学和表观遗传学密切相关。推测喂食 SFPS 后可能对果蝇的基因组的表达模式产生影响,同时,其还可能影响亲代和子代的表观遗传学,但内在的机制有待进一步研究。

综上所述,本课题组采取热提醇沉方法得到性质稳定的 SFPS,以黑腹果蝇为模式生物,选取合适浓度 SFPS 进行处理。结果表明,低和中浓度 SFPS 分别对雌性和雄性果蝇的生育力有显著的促进作用。本研究为接下来 SFPS 的活性研究奠定科学基础,并为 SFPS 的开发提供依据。

#### 参考文献

- [1] 张展,刘建国.羊栖菜的研究评述[J].海洋水产研究,2002,9(23):67-69.
- [2] 季宇彬,高世勇.羊栖菜多糖体外抗肿瘤作用及其作用机制的研究[J].中草药,2003,34(12):1111-1114.
- [3] Wang W, Lu J B, Wang C, et al. Effects of *Sargassum fusiforme* polysaccharides on antioxidant activities and intestinal functions in mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 58(1): 127-132.
- [4] Wu M J, Wu Y, Qu M, et al. Evaluation of antioxidant activities of water-soluble polysaccharides from brown alga *Hizikia fusiformis* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 56(3): 28-33.
- [5] Zhou J, Hu N, Wu Y L, et al. Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant properties of acidic polysaccharides from *Sargassum fusiforme* [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008, 9(1): 721-727.
- [6] Chen X M, Nie W J, Yu G Q, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Sargassum fusiforme* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012a, 50(1): 695-700.
- [7] Chen X M, Nie W J, Yu G Q, et al. A polysaccharide from *Sargassum fusiforme* protects against immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2012b, 90(2): 1114-1119.
- [8] 司晓喜,袁智泉,邱贺媛,等.海藻有效成分的提取分离研究进展[J].延边大学学报,2011,37(2):103-104.
- [9] 尹尚君,徐涛,刘丽平,等.羊栖菜岩藻黄质的提取工艺研究[J].食品工业科技,2011,4:272-274.
- [10] Ferreira C, Sousa M, Rabaça A, et al. Impact of metformin on male reproduction [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(25): 3621-3633.
- [11] Alves M G, Martins A D, Vaz C V, et al. Metformin and male reproduction: effects on Sertoli cell metabolism [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(4): 1033-1042. Doi: 10.1111/bph.12522.
- [12] 陈玉冬,邹志华,王艺磊,等. vasa 基因研究进展[J].动物学杂志,2010,45(4):173-180.
- [13] 张鹏杰. RNAi 提高家蚕对 BmNPV 的抗性及其家蚕精细胞发育相关基因 Achi 功能的研究[D].苏州:苏州大学,2012.
- [14] 王慧丹. 卵巢早衰的相关因素分析及 WT1、DMC1 基因在卵巢早衰发病机制中的作用研究[D]. 济南:山东大学,2015.
- [15] 蔡松智,吴登俊,张中显,等. mTOR 对信号通路调控的研究进展[J].中国畜牧杂志,2010,46(1):57-60.
- [16] 李伟,张旭,吴明江. HPLC 法分析羊栖菜与铜藻多糖的单糖组成[J].高师理科学刊,2015,35(7):49-51.
- [17] 谢何杰,叶慧娟,沈婷,等.羊栖菜化学成分和药理活性的研究进展[J].浙江农业科学,2014(4):487-491.
- [18] 徐曼妮,张欣文,徐思红.邻苯二甲酸二丁酯对雌性果蝇生育力的影响[J].同济大学学报,2008,29(2):53-54.
- [19] Matzkin L M, Johnson S, Paight C, et al. Dietary protein and sugar differentially affect development and metabolic pools in ecologically diverse drosophila [J]. *J Nutr*, 2011, 141(6): 1127-1133.
- [20] 季宇彬,高世勇,张秀娟,等. SFPS 抗肿瘤作用及其作用机制的研究[J].中国海洋药物,2004,4:7-10.
- [21] 季宇彬,高世勇,孔琪,等. SFPS 对肿瘤细胞 P53 基因蛋白表达的影响[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2001,17:1-3.
- [22] 岑颖洲,马夏军,王凌云,等. SFPS 的制备及其对 HepG2 细胞的抑制作用[J].中国海洋药物,2005,24(1):20-22.
- [23] 王尊文,华玉琴,李国平,等. SFPS 对高血脂模型大鼠血脂和抗氧化功能的影响[J].中国海洋药物,2008,27:13-15.
- [24] 倪小芬,郑超,田吉来,等. SFPS 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导胰岛 β 细胞凋亡的保护作用及 PI3K 抑制剂的影响[J].中华中医药学刊,2009,27:1506-1508.