

# 高脂饮食诱导果蝇心衰模型的建立

吴红梅<sup>1</sup>, 刘学文<sup>1</sup>, 文格波<sup>2</sup>, 唐旻<sup>1\*</sup>

(1. 生物化学与分子生物学研究所, 南华大学, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学第一附属医院, 湖南 衡阳 421001)

**【摘要】 目的** 建立高脂饮食诱导的果蝇心衰模型。**方法** 选择野生型果蝇 *w<sup>1118</sup>* 果蝇作为实验对象, 采用含不同浓度椰油(0%, 7.5%, 15%, 30%)食物喂食果蝇5 d, 检测果蝇体内的三酰甘油含量。后续实验以非高脂喂食组(0%椰油)作为对照, 30%椰油高脂喂食组作为实验组。负向趋地性实验检测果蝇运动能力。果蝇成体心脏功能分析平台, 拍摄果蝇在半解剖条件下的心脏跳动情况(30 s), 软件分析获得成体心脏功能指标, 包括心跳周期, 收缩和舒张直径, 心脏收缩力指数等。实时定量PCR检测高脂喂食果蝇心脏的RNA表达变化。**结果** 与非高脂喂食果蝇相比, 不同比例高脂喂食果蝇的三酰甘油含量随椰油浓度呈剂量递增( $P < 0.05$ ); 高脂饮食显著影响果蝇活动力( $P < 0.001$ ); 高脂喂食果蝇的心跳周期缩短( $P < 0.01$ ), 心脏收缩力减弱( $P < 0.001$ ); 实时定量PCR发现高脂喂食果蝇中, 参与脂代谢相关的一些基因 *fa2h*, *CG6277*, *CG3699*, *CG9914*, *lip2* 的表达明显下调( $P < 0.05$ )。**结论** 高脂饮食严重影响果蝇运动能力和成体心脏功能, 成功建立了高脂饮食诱导的果蝇心衰模型。

**【关键词】** 果蝇; 心衰; 高脂饮食; 代谢; 三酰甘油

**【中图分类号】** Q95-33

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1005-4847(2018) 06-0688-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.06.003

## Establishment of a high-fat-diet-induced heart failure model in *Drosophila melanogaster*

WU Hongmei<sup>1</sup>, LIU Xuewen<sup>1</sup>, WEN Gebo<sup>2</sup>, TANG Min<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, University of South China, Hengyang 421001, China.

2. the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001)

Corresponding author: TANG Min. E-mail: mtang2014@163.com

**【Abstract】 Objective** To establish a high-fat-diet-induced heart failure model in *Drosophila melanogaster*. **Methods** Wild-type *Drosophila w<sup>1118</sup>* was chosen as the experimental subject. The triglyceride level was examined in *Drosophila* fed with different concentrations of coconut oil (0%, 7.5%, 15%, 30%). In the follow-up experiment, a high-fat diet containing 30% coconut oil was used for the experimental group, in contrast to a non-fat diet (0% coconut oil) for a control group. Using *Drosophila* negative geotaxis assay, the physical activity was evaluated. The pulse was recorded for 30 s and analyzed. Adult heart physiological parameters, including heart period, systolic and diastolic diameters, as well as fractional shortening, were obtained. The RNA expression of metabolism-related genes was measured by real-time PCR. **Results** The triglyceride content in high-fat-diet-fed *Drosophila* increased gradually with the concentration of coconut oil ( $P < 0.05$ ). High-fat-diet-fed *Drosophila* showed dramatically decreased physical activity ( $P < 0.001$ ), as determined using the negative geotaxis assay, and compromised adult physiological heart function, characterized by a decreased heart period and fractional shortening ( $P < 0.05$ ). Metabolism-related genes, including *fa2h*, *CG6277*, *CG3699*, *CG9914*, and *lip2*, were downregulated in high-fat-diet-fed *Drosophila* compared with the levels in those with a non-fat diet. **Conclusion** The high-fat diet compromises physical activity and adult heart physiological

[基金项目] 国家自然科学基金(81500311, 81711530050); 湖南省科技厅课题(2015KJT01)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81500311, 81711530050), and Key Program of Hunan Provincial Department of Science and Technology (2015JC3080)。

[作者简介] 唐旻(1984—)女, 副教授, 研究方向: 果蝇心衰的表观遗传调控学研究。Email: mtang2014@163.com

function, revealing that a high-fat-diet-induced *Drosophila* heart failure model is successfully established here.

**[Keywords]** *Drosophila*; heart failure; high-fat diet; metabolism; triglyceride

**Conflict of interest statement:** We declare that we have no conflict of interest statement.

随着物质生活水平的提高,人们摄入大量的高脂肪食物导致体重超标,甚至出现过度肥胖和代谢紊乱,并引起一系列心血管疾病,如糖尿病、冠心病和心衰<sup>[1-2]</sup>。在正常生理情况下,线粒体将心肌细胞储存在脂肪酸和葡萄糖中的化学能转化为高能磷酸化合物 ATP,为心脏收缩提供能量。脂肪酸和葡萄糖氧化生成的还原当量 NADH 或者 FADH<sub>2</sub>,在氧化磷酸化过程中形成一个跨线粒体内膜的质子电化学梯度, H<sup>+</sup> 从线粒体内膜面顺浓度梯度经 ATP 合酶流回基质面时,ATP 生成<sup>[3]</sup>。高脂饮食导致心肌细胞中脂肪酸和葡萄糖的代谢发生紊乱,细胞收缩功能相关的 ATP 利用率降低,心脏收缩功能受到抑制,心衰发生<sup>[4]</sup>。敲除小鼠脂酶 *Atgl* 导致大量的脂肪聚集,出现严重的心肌病<sup>[5]</sup>。且有研究发现游离的脂肪酸促进 H<sup>+</sup> 经解偶联蛋白回流至线粒体基质中,导致 ATP 生成不足,心脏收缩功能缺陷<sup>[6]</sup>。因此,心肌能量代谢紊乱是心衰发生的重要机制之一。

果蝇是研究人类疾病的经典模式动物,65% 人类疾病基因在果蝇中找到同源基因<sup>[7]</sup>。果蝇心脏发育过程与人类早期胚胎心血管发育极其相似,例如,果蝇心脏发育基因 *tinman* 的同源基因 *nkx2.5* 在哺乳动物中参与同样的功能<sup>[8]</sup>。另外,哺乳动物代谢相关的酶类在果蝇中亦高度保守<sup>[9-10]</sup>。近年来新技术的发展,尤其是成体心脏功能分析平台在果蝇中建立,促进发现了一系列基因的新功能,如转录因子 *pygopus*, 信号转导蛋白编码基因 *integrin-linked kinase*, 以及神经酰胺酶 *cdase*, 参与成体心脏功能<sup>[11-14]</sup>。基于果蝇的高度保守性以及完善的成体心脏功能分析平台,高脂饮食诱导果蝇心衰模型的建立将为研究心衰发生发展的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

野生型黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 品系 w1118, 来自于美国伯明翰品系中心,饲养于南华大学果蝇培养室,昼夜各半交替。

#### 1.1.2 果蝇培养基

1 L 培养基中含有玉米粉 84 g,蔗糖 62 g,琼脂 6 g,酵母粉 6 g,丙酸 6 mL,为本实验中的非高脂食物(non-fat diet, NFD) 配方。在非高脂食物的基础

上加入了 7.5%, 15%, 或者 30% 的椰油(百分数为非高脂食物与椰油的重量比),作为含不同浓度椰油的高脂食物(high-fat diet, HFD) 配方。

#### 1.1.3 实验试剂与仪器

NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, HEPES, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Sucrose, Trehalose 购于上海生工,三酰甘油测定试剂(Thermo Fisher, TR22421), Trizol (Invitrogen, 15596026), DNase I (Invitrogen, AM2222), Eva Green 荧光染料(Solis BioDyne, 08-25-00001), cDNA 合成试剂盒(Applied Biosystems, 4368814)。

果蝇成体心脏生理学功能分析系统,该系统由高速 EM-CCD 摄像机(Hamamatsu C9300, 日本)和 Semi-automatic heartbeat 数据采集分析软件组成。荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad CFX connect, 美国),小型离心机(Eppendorf 5424, 德国),PCR 仪(Bio-Rad T100, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 果蝇饲养

收集 5 ~ 10 d 新孵化的雌性果蝇,分组用非高脂食物, 7.5%, 15%, 30% 高脂食物在 20℃ 下培养 5 d(椰油的熔点在 22℃ 左右)。

#### 1.2.2 三酰甘油含量测试

收集 5 ~ 10 d 新孵化的雌性果蝇,分组用非高脂食物, 7.5%, 15%, 30% 高脂食物在 20℃ 下培养 5 d,然后转入空管中放置 30 min,再转移至 1.5 mL Eppendorf 管中(每管 12 只),称量其体重, -80℃ 冻存。在 Eppendorf 管中加入 1:1 的氯仿和甲醇混合液 100 μL,研磨, 4000 r/min 离心 5 min。取 5 μL 上清液加入 170 μL 三酰甘油测定试剂, 37℃ 反应 10 min,分光光度计测量 OD 550 下的吸光度值。根据标准曲线,测量三酰甘油的绝对含量。三酰甘油相对含量 = 三酰甘油绝对含量/果蝇体重。

#### 1.2.3 负向趋地性测试

果蝇有天生的负向趋地性。当果蝇被放入竖直放置的直管中,它们本能的向上爬行,爬行速度反映了果蝇运动能力。将 20 只果蝇倒入标有刻度的直管中,用固定装置固定。将固定好的直管敲击桌面,从果蝇全部震下去的那一刻开始计时,摄像 5 s,记录果蝇第 5 s 时所在的高度(直管刻度标记)。根据三酰甘油测试结果,实验设计非高脂组 NFD 和 30% 高脂组 HFD,每组记录 100 只果蝇,每

只果蝇测试 5 次,以确保实验的可重复性。

1.2.4 成体心脏功能分析

FlyNap 麻醉 NFD 和 30% HFD 组果蝇 2~5 min; 在拟果蝇体液内环境的缓冲液 (108 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 8 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 15 mmol/L HEPES, 1 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 10 mmol/L Sucrose, 5 mmol/L Trehalose, pH = 7.1) 下解剖果蝇,去除腹部表皮及相连内脏,真空泵小心吸取去除脂肪组织。高速 EM-CCD 摄像机以 130 帧/s 的速度拍摄果蝇心脏跳动 30 s,获得 M-mode 图。M-mode 图以时间为 X 轴,展现了果蝇心壁边缘对称的两点随时间轴移动的轨迹变化图。通过软件分析获得果蝇的收缩和舒张直径,心跳周期、心脏收缩力以及心脏是否规律跳动等成体心脏生理功能分析指标。心脏收缩力 = (舒张直径-收缩直径)/舒张直径。详细方法见文献<sup>[15]</sup>。

1.2.5 RNA 提取和实时定量 PCR

收集 NFD 和 30% HFD 组果蝇心管,每组 3 个生物样品重复,每个样品 50 只果蝇心管,Trizol 试剂按照常规步骤提取 mRNA。DNase I 消化 RNA 样品中的残留 DNA,然后取 1 μg RNA 做反向 PCR 合成 cDNA 20 μL,再稀释 10 倍。取 2 μL 稀释的 cDNA 为模板,Eva Green 作为荧光染料,以 28S rRNA 作为内参基因,荧光实时定量 PCR 测量 *fa2h*, *CG6277*, *CG3699*, *CG9914*, *lip2* 等基因的表达情况。28S rRNA 引物序列 F: CCCAGTGCTCTGAATGTCAA, R: ATGACGAGGCATTTGGCTAC; *fa2h* 引物序列 F: CCAAAGTCGAGCCAAAGGGA, R: CAGTCCACTAG GTGCTCCATAC; *CG6277* 引物序列 F: ACTACCATC AGTTGTGGGCTC, R: GACGCGCTCAGATTCCTTGA; *CG3699* 引物序列 F: GCCCTCGATCAGTTCA CCAA, R: GTCGACGATGCCAATGTTCC; *CG9914* 引物序列 F: AAGGCGCTCTACAAGCAGTT, R: TCGACCAG AGGCACGTAGTA; *lip2* 引物序列 F: AAGGCGCACA TAATTCGGC, R: ATTGTGCACTTCGTGGCTGA。

1.3 统计学方法

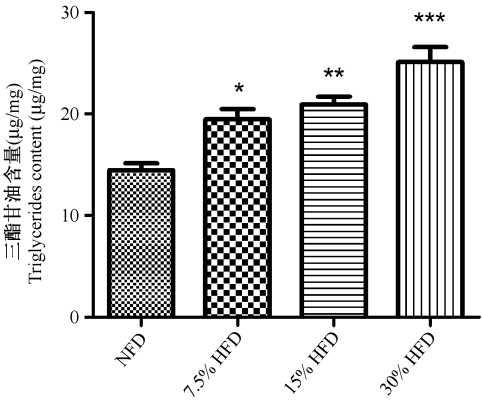
所得数据采用 GraphPad Prism 5.0 软件处理,组间比较采用 *t*-检验或卡方检验,*P* < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂饮食导致果蝇体内三酰甘油含量升高

采用三酰甘油检测试剂盒测试了高脂喂食果蝇体内的三酰甘油含量,结果显示:非高脂喂食果蝇,7.5%,15%,30% 高脂喂食果蝇体内三酰甘油含

量分别为 14.5,19.5,21.0,25.1 μg/mg(图 1)。随着食物中椰油含量的递增,果蝇体内三酰甘油含量呈逐渐递增的趋势,与人类相近。后续实验只选取 30% 椰油喂食果蝇作为实验组(HFD 组),非高脂食物喂食果蝇作为对照组(NFD 组)。



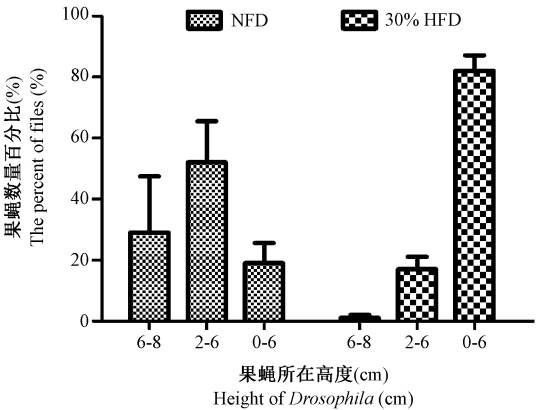
注:3 次生物样品重复,*t*-检验,\**P* < 0.05,\*\**P* < 0.01,\*\*\**P* < 0.0001。  
图 1 高脂喂食果蝇体内三酰甘油含量随椰油浓度呈剂量递增

Note. 3 biological replicates, *t*-test, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

Figure 1 The triglyceride level is dose-dependently increased with coconut oil

2.2 高脂饮食将显著影响果蝇活动力

负向趋地性实验,拍摄第 5 s 时果蝇所在的高度。结果显示:高脂喂食果蝇(30% 椰油),在 6~8 cm 处、2~6 cm 处、2 cm 以下的比例分别为 29%,52% 和 19%,而高脂喂食果蝇的比例分别为 1%,17%,和 82%(图 2)。约 80% 的非高脂喂食果蝇位于 2 cm 以上位置,相反,约 80% 的高脂喂食果蝇位于 2 cm 以下位置,提示果蝇活动能力减弱。



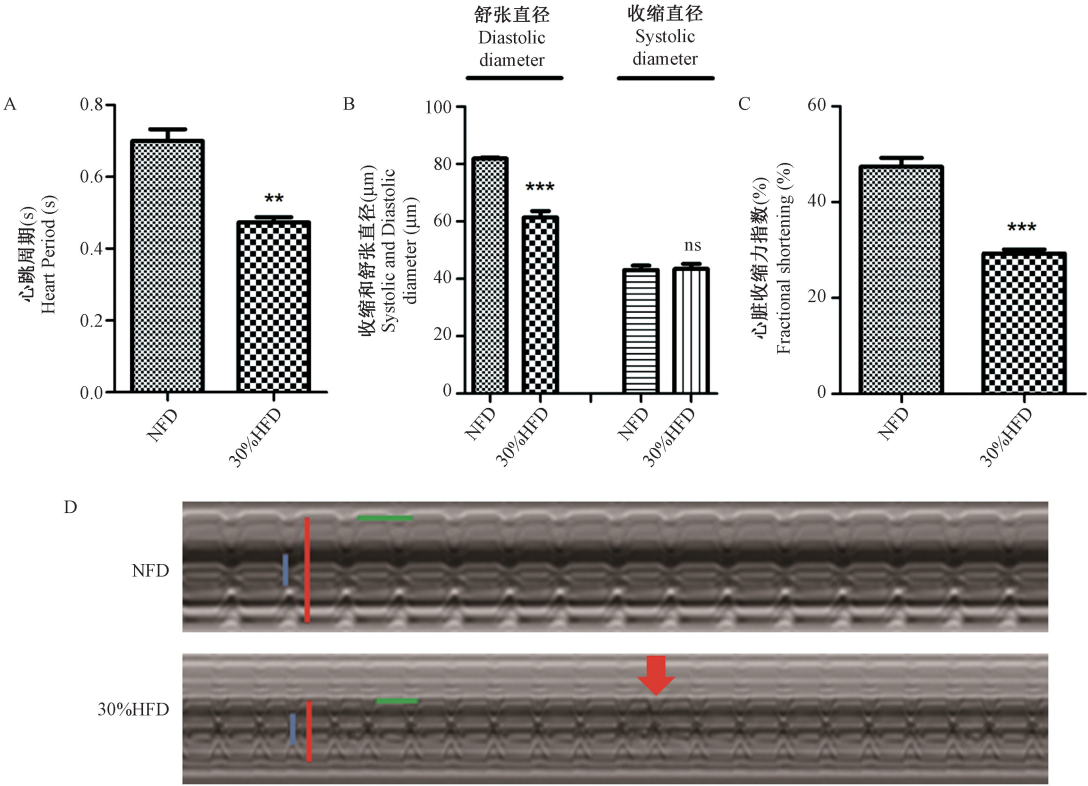
注:每组 100 只果蝇,每只果蝇统计 5 次。卡方检验,*P* < 0.001。  
图 2 负向趋地性实验发现高脂喂食果蝇活动力减弱  
Note. 100 flies were tested in each group. Each fly was counted 5 times. Chi-squared test, *P* < 0.0001.

Figure 2 High-fat diet altered physical activity in *Drosophila* using negative geotaxis assay

2.3 高脂饮食导致心脏功能衰退

利用果蝇成体心脏生理学功能分析平台,拍摄果蝇在半解剖条件下的心脏跳动情况。结果发现,高脂食物喂食果蝇导致心跳周期缩短(图 3A),心脏舒张直径明显减小(图 3B),心脏收缩直径不变

(图 3B),心脏收缩力明显下降(图 3C),其差异有显著性( $P < 0.05$ );果蝇心电图 M-mode 显示心脏跳动出现了轻微的心率不齐现象(图 3D)。高脂饮食诱导的果蝇心衰模型建立。



注:每组分析 25 只果蝇, $t$ -检验,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;M-mode 图,蓝色线条代表收缩直径,红色线条代表舒张直径,绿色线条代表心跳周期,红色箭头处有轻微的不规律跳动情况。

图 3 高脂饮食诱导心脏功能紊乱

Note. At least 20 flies were analyzed per each group.  $t$ -test, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . M-mode; blue line and red line represent systolic diameter and diastolic diameter respectively. Green line represents heart period. Red Arrow points to irregular heart beat.

Figure 3 High-fat diet treatment induced heart failure in *Drosophila Melanogaster*

2.4 代谢相关基因的表达变化

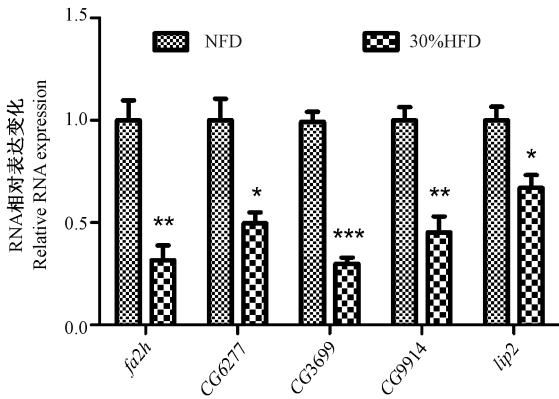
为了进一步研究高脂饮食诱导果蝇心衰的分子机制,检测了高脂喂食果蝇心脏的 RNA 表达变化,结果显示:与正常喂食果蝇相比,参与代谢相关基因 *fa2h*, *CG6277*, *CG3699*, *CG9914*, *lip2* 的表达明显下调,分别为正常对照的 31.7%, 49.7%, 30.0%, 45.3%, 67.0% (图 4),提示果蝇心脏功能紊乱与脂代谢失调相关。

3 讨论

高脂饮食可引起多个基因、多个器官的变化,与癌症、糖尿病以及心血管疾病都存在着正相关性,很难确定它对特定疾病的影响。且心衰是一个复杂的病理性过程,多因素参与。高脂饮食人群常

常伴随着冠状动脉粥样硬化导致心肌缺血,进而发展为心力衰竭,直接作用于心肌细胞的脂毒性很难被研究。果蝇是一个开放的淋巴循环系统,直接由支气管供养,避免了由于心肌缺血而导致的心力衰竭。且果蝇的遗传分析技术手段成熟,解决了在小鼠中研究多基因遗传相互作用困难的问题。因此,利用简单的模式动物果蝇作为研究模型,建立高脂饮食诱导心衰模型,将帮助人们从心肌细胞能量代谢的角度阐释心衰发生发展的分子机制。

心力衰竭是指由于心脏收缩或舒张功能发生障碍,不能将静脉回心血量充分排出心脏。实验结果显示高脂喂食果蝇三酰甘油含量显著性升高且出现了心脏收缩力下降等一系列心脏功能紊乱,与高脂喂食小鼠的心衰表型基本一致<sup>[16]</sup>,提示高脂饮



注:以 28S *rRNA* 作为内参基因,比较非高脂喂食果蝇和高脂喂食果蝇心脏 RNA 表达变化, *t*-检验, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001。

图 4 高脂饮食导致心脏代谢相关基因表达下调

Note. Compare the relative expression changes between NFD and HFD treatment with 28S *rRNA* as reference gene, *t*-test, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

Figure 4 High-fat diet treatment causes the down regulation of metabolic gene

食诱导的心衰模型建立成功。实时定量 PCR 实验发现,脂酶编码基因 *CG6277* 和 *lip2* 表达下调。脂酶催化脂类的酯键水解,参与脂类的消化和运输中,可以将三酰甘油转化为甘油和脂肪酸。且参与脂肪酸 β-氧化的辅酶 A 脱氢酶基因 *CG9914* 和 *CG3699* 表达下调,而心脏所需 ATP 大约 70% 来自脂肪酸氧化,因此我们推测脂代谢受到抑制可能是高脂饮食诱导果蝇心衰发生的主要原因。

环境因素与遗传因素一起共同参与心衰的发生<sup>[17]</sup>。Xiao 等<sup>[18]</sup>报道了 DNA 甲基化参与了心肌肥大的发生,心脏收缩力明显下降。大鼠全基因组测序显示 H3K4me3 在正常和心衰心肌细胞中存在显著差异<sup>[19]</sup>。表观遗传学修饰与心血管疾病的发生存在着相关性,饮食可以改变基因表观遗传学修饰<sup>[20-22]</sup>。因此,我们期待通过构建高脂饮食诱导果蝇心衰模型,为研究高脂饮食-表观遗传修饰-心衰发生的基因调控网络奠定基础。

参 考 文 献(References)

[ 1 ] Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome [J]. Lancet, 2005, 365(9468):1415-1428.  
[ 2 ] Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, et al. Obesity and the risk of heart failure [J]. N Engl J Med, 2002, 347(5):305-313.  
[ 3 ] Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure; a question of balance [J]. J Clin Invest, 2005, 115(3):547-555.  
[ 4 ] Goldberg IJ, Trent CM, Schulze PC. Lipid metabolism and toxicity in the heart [J]. Cell Metab, 2012, 15(6):805-812.  
[ 5 ] Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, et al. Defective

lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase[J]. Science, 2006, 312(5774):734-737.  
[ 6 ] Garlid KD, Orosz DE, Modriansk M, et al. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein [J]. J Biol Chem, 1996, 271(5):2615-2620.  
[ 7 ] Ugur B, Chen K, Bellen HJ. Drosophila tools and assays for the study of human diseases [J]. Dis Model Mech, 2016, 9(3):235-244.  
[ 8 ] Bodmer R, Venkatesh TV. Heart development in Drosophila and vertebrates; conservation of molecular mechanisms [J]. Dev Genet, 1998, 22(3):181-186.  
[ 9 ] Baker KD, Thummel CS. Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in Drosophila [J]. Cell Metab, 2007, 6(4):257-266.  
[10] Trinh I, Boulianne GL. Modeling obesity and its associated disorders in Drosophila [J]. Physiology, 2013, 28(2):117-124.  
[11] Nishimura M, Kumsta C, Kaushik G, et al. A dual role for integrin-linked kinase and beta1-integrin in modulating cardiac aging [J]. Aging cell, 2014, 13(3):431-440.  
[12] Ocorr K, Vogler G, Bodmer R. Methods to assess Drosophila heart development, function and aging [J]. Methods, 2014, 68(1):265-272.  
[13] Tang M, Yuan W, Fan X, et al. Pygopus maintains heart function in aging Drosophila independently of canonical Wnt signaling [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2013, 6(5):472-480.  
[14] Walls SM, Cammarato A, Chatfield DA, et al. Ceramide-protein interactions modulate ceramide-associated lipotoxic cardiomyopathy [J]. Cell Rep, 2018, 22(10):2702-2715.  
[15] Vogler G, Ocorr K. Visualizing the beating heart in Drosophila [J]. J Vis Exp, 2009(31).  
[16] Fang CX, Dong F, Thomas DP, et al. Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(3):H1206-H1215.  
[17] O'Toole TE, Conklin DJ, Bhatnagar A. Environmental risk factors for heart disease [J]. Rev Environ Health, 2008, 23(3):167-202.  
[18] Xiao D, Dasgupta C, Chen M, et al. Inhibition of DNA methylation reverses norepinephrine-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. Cardiovasc Res, 2014, 101(3):373-382.  
[19] Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, et al. Genome-wide histone methylation profile for heart failure [J]. Genes Cells, 2009, 14(1):69-77.  
[20] Choi SW, Friso S. Epigenetics; a new bridge between nutrition and health [J]. Adv Nutr, 2010, 1(1):8-16.  
[21] Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(44):17046-17049.  
[22] 张辉,周晓慧,范慧敏,等. 生物学标志物在心衰衰竭早期诊断中作用的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(1):102-106.  
Zhang H, Zhou XH, Fan HM, et al. Research progress of the role of biological markers in early diagnosis of heart failure [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(1):102-106.