

## 哺乳动物细胞多不饱和脂肪酸合成酶系的重建将亚油酸代谢转变为二十二碳六烯酸

朱贵明, Abdulmomen Ali Mohammed Saleh, Said Ahmed Bahwal, 邱立红, 孙洁, 商宇, 江旭东, 葛堂栋, 张涛

佳木斯大学基础医学院, 黑龙江 佳木斯 154007

朱贵明, Abdulmomen Ali Mohammed Saleh, Said Ahmed Bahwal, 等. 哺乳动物细胞多不饱和脂肪酸合成酶系的重建将亚油酸代谢转变为二十二碳六烯酸. 生物工程学报, 2015, 31(2): 281-290.

Zhu GM, Saleh AAM, Bahwal SA, et al. Reconstitution of polyunsaturated fatty acid synthesis enzymes in mammalian cells to convert LA to DHA. Chin J Biotech, 2015, 31(2): 281-290.

**摘要:** 二十二碳六烯酸 (DHA, 22:6n-3) 是一种长度为 22 个碳原子且含有 6 个双键的  $\omega$ -3 系多不饱和脂肪酸, 在人体中具有重要生物学功能。人体及其他哺乳动物体内只能合成少量的 DHA, 更多的需求必须从食物中获取。然而, DHA 的天然资源 (主要是深海鱼类等海洋产品) 日趋枯竭, 开发新型资源以满足不断扩大的市场需求势在必行。本研究利用转基因技术, 在哺乳动物细胞中使  $\Delta$ 6 和  $\Delta$ 5 脂肪酸去饱和酶以及  $\Delta$ 6 和  $\Delta$ 5 脂肪酸延长酶超表达, 同时表达来源于秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 的  $\Delta$ 15 去饱和酶和小眼虫 *Euglena gracilis* 的  $\Delta$ 4 去饱和酶, 结果表明, 这 6 种酶的表达或超表达能将  $\omega$ -6 系的亚油酸 (LA, 18:2n-6) 有效地转化为 DHA (22:6n-3), 后者的含量从对照组的 16.74% 提高到实验组的 25.3%。本研究的策略及技术路线为将来利用遗传改造的哺乳动物生产珍稀的 DHA (22:6n-3) 等长链多不饱和脂肪酸产品提供了重要的启示。

**关键词:** 多不饱和脂肪酸, 脂肪酸去饱和酶, 脂肪酸延长酶, 多基因表达载体, 转基因

**Received:** April 19, 2014; **Accepted:** July 11, 2014

**Supported by:** Science and Technology Research Project of Heilongjiang Provincial Education Department (No. 12511563).

**Corresponding author:** Guiming Zhu. Tel: +86-454-8618331; E-mail: xi78926@sina.com

黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (No. 12511563) 资助。

网络出版时间: 2014-08-01

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140235.html>

## Reconstitution of polyunsaturated fatty acid synthesis enzymes in mammalian cells to convert LA to DHA

Guiming Zhu, Abdulmomen Ali Mohammed Saleh, Said Ahmed Bahwal, Lihong Qiu, Jie Sun, Yu Shang, Xudong Jiang, Tangdong Ge, and Tao Zhang

College of Basic Medicine, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang, China

**Abstract:** DHA (22:6n-3) is a  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid with 22 carbon atoms and 6 double bonds, which has important biological functions in human body. Human and other mammals synthesize only limited amounts of DHA, more requirements must be satisfied from food resources. However, the natural resources of DHA (Mainly deep-sea fish and other marine products) are prone to depletion. New resources development is still insufficient to satisfy the growing market demand. Previous studies have revealed that the mammals can increase the synthesis of DHA and other long-chain polyunsaturated fatty acids after transgenic procedures. In this study, mammalian cells were transfected with  $\Delta$ 6,  $\Delta$ 5 desaturase,  $\Delta$ 6,  $\Delta$ 5 elongase,  $\Delta$ 15 desaturase (Isolated from nematode *Caenorhabditis elegans*) and  $\Delta$ 4 desaturase (Isolated from *Euglena gracilis*), simultaneously. Results show that the expression or overexpression of these 6 enzymes is capable of conversion of the  $\omega$ -6 linoleic acid (LA, 18:2n-6) in DHA (22:6n-3). DHA content has increased from 16.74% in the control group to 25.3% in the experimental group. The strategy and related technology in our research provided important data for future production the valuable DHA (22:6n-3) by using genetically modified animals.

**Keywords:** polyunsaturated fatty acid, fatty acid desaturase, fatty acid elongase, multiple-gene expression vector, transgene

DHA (Docosahexaenoic acid, 22:6n-3) 是一种碳链长为 22C 且含有 6 个双键的  $\omega$ -3 系的多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFA), 俗称“脑黄金”, 通常来源于深海鱼油以及一些藻类等生物<sup>[1]</sup>。DHA 在人体内的生物学功能例如促进大脑及其他中枢神经系统的发育、提高婴幼儿认知能力、抗炎症反应及抗肿瘤作用等已经有了比较深入的研究和揭示<sup>[1-6]</sup>。目前, DHA 制品已经被广泛加入婴幼儿食品等食物及其他保健品中, 并被用于抗炎症及抗肿瘤等相关疾病治疗的辅助药物<sup>[7-10]</sup>。然而, 随着深海鱼类等资源的枯竭以及污染等问题, DHA 的自然来源却越来越受到限制。因此, 开发 DHA 等多不饱和脂肪酸新型产品以满足人类的需求

成了必经之路。

相对于深海鱼类等海洋食物资源, 陆地型的动植物食物资源才是世界范围内更多人群的主要选择, 陆地型的肉类食品更是占有重要的地位。这些动物脂肪以饱和脂肪酸为主, 不饱和脂肪酸含量很低, DHA 等多不饱和脂肪酸则更低, 例如 100 g 猪肉仅含 2 mg DHA, 100 g 牛肉仅含 1 mg DHA<sup>[11]</sup>。这种不平衡的动物脂肪酸已经成为了现今危害人们健康的重大因素。事实上, 哺乳动物中存在比较完整的多不饱和脂肪酸去饱和酶和延长酶, 它们交替作用, 可以将来源于植物油脂的  $\alpha$ -亚麻酸 (ALA, 18:3n-3) 转化成为 DPA (22:5n-3)。接下来, DPA (22:5n-3) 进入“Sprecher”途径, 进一步延长为 24:5n-3, 再

由  $\Delta 6$ -脂肪酸去饱和酶转变为 24:6n-3, 最后经  $\beta$ -氧化后生成 DHA (22:6n-3)<sup>[12-13]</sup>。然而, 上述过程的效率很低 (小于 1%)<sup>[14-16]</sup>, 说明哺乳动物具有某种抑制 DHA (22:6n-3) 等长链多不饱和脂肪酸高水平合成的机制。

我们的前期研究应用转基因技术将哺乳动物来源的  $\Delta 6$  和  $\Delta 5$  脂肪酸去饱和酶以及  $\Delta 6$  和  $\Delta 5$  脂肪酸延长酶 4 种酶的编码基因构建成为一个多基因表达载体, 然后转染哺乳动物细胞 HEK293T, 实现了 4 个目的基因的超表达。气质联用 (GC-MS) 分析证实了添加在细胞培养基中的底物 ALA (18:3n-3) 被细胞摄取后能有效地转化成为 DHA (22:6n-3), 其含量较对照组细胞提高了 2.5 倍<sup>[17]</sup>。在另一项研究中, 我们将来源于线虫 *C. elegans* 的  $\Delta 15$  去饱和酶基因和小眼虫 *Euglena gracilis* 的  $\Delta 4$  去饱和酶基因构建成为一个双基因表达载体转染胞 HEK293T, 结果证明  $\Delta 4$  去饱和酶可与  $\Delta 15$  去饱和酶协同作用, 即  $\Delta 15$  去饱和酶不仅将添加的亚油酸 (LA, 18:2n-6) 和花生四烯酸 (ARA, 20:4n-6) 转化为 ALA (18:3n-3) 和 EPA (20:5n-3), 而且也能将 22:4n-6 (为 20:4n-6 经过延长作用的产物) 转化为 DPA (22:5n-3);  $\Delta 4$  去饱和酶活性则正好将细胞中积累的 DPA (22:5n-3) 直接转化为 DHA (22:6n-3), 而不必经过复杂而低效的“Sprecher”途径<sup>[18]</sup>。尽管这两项研究均能够有效提高了 DHA 的水平, 但在实践中可能会受到一些限制, 例如第一项研究需要添加 ALA, 而自然界 ALA 的资源分布远少于 LA, 且远不如 LA 经济; 第二项研究在添加 LA 的同时也要添加 ARA 才能够有效获得 DHA, 而 ARA 价格也昂贵。最佳的思路是找到一种策略可将 LA 有效转化为 DHA。

本研究将上述两项研究结合起来, 将含  $\Delta 6$  和  $\Delta 5$  脂肪酸去饱和酶以及  $\Delta 6$  和  $\Delta 5$  脂肪酸延长酶编码基因的多基因表达载体, 与含  $\Delta 15$  去饱和酶和  $\Delta 4$  去饱和酶编码基因的双基因表达载体共转染哺乳动物细胞, 使上述 6 种酶联合表达 (或表达), 实现了将唯一添加到细胞培养基中的 LA (18:2n-6) 逐步代谢转化为 DHA (22:6n-3), 为动物个体的遗传改造提供可行性依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、质粒 pcDNA3.1(-)以及下文中各种基因表达质粒载体均为本实验室保存。HEK293T 细胞购于中国协和医科大学细胞库。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、总 RNA 提取试剂 RNAiso plus、RT-PCR 试剂盒等购于宝生物工程 (大连) 有限公司。质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒等购于天根生化科技 (北京) 有限公司。转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 为 Invitrogen 公司产品。细胞培养所用培养基、血清、培养皿等为 Hyclone 产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因表达载体的构建

多基因表达载体 pcDNA3.1-F2F1-E5E2 的构建: 来源于人的  $\Delta 6$ -脂肪酸去饱和酶基因 (*Fads2*, 编码 445 个氨基酸) 和  $\Delta 5$ -脂肪酸去饱和酶基因 (*Fads1*, 编码 448 个氨基酸) 以及来源于小鼠的  $\Delta 6$ -脂肪酸延长酶基因 (*Elovl5*, 编码 300 个氨基酸) 和  $\Delta 5$ -脂肪酸延长酶基因 (*Elovl2*, 编码 297 个氨基酸) 4 个基因构建为一个多基因表达载体 pcDNA3.1-F2F1-E5E2。在该

载体中, 每个目的基因各自有独立的启动子和终止信号 polyA, 故能独立表达不相互影响。此多基因表达载体总大小为 12 760 bp。具体的载体构建方法参照文献[19]。

双基因表达载体 pcDNA3.1-sD15-sEgD4 的构建: 将线虫 *C. elegans* 的  $\Delta 15$  去饱和酶基因 sD15 (GenBank Accession No. NM\_001028389) cDNA 序列 (编码框全长为 1 200 bp) 和小眼虫 *Euglena gracilis* 的  $\Delta 4$  去饱和酶基因 sEgD4 (GenBank Accession No. AY278558) 的 cDNA 序列 (编码框全长为 1 626 bp) 分别进行密码子优化并克隆到表达载体 pcDNA3.1, 然后再构建两者的双基因表达载体 pcDNA3.1-sD15-sEgD4。具体的载体构建方法参照文献[18]。

### 1.2.2 细胞培养和瞬时转染

HEK293T 细胞生长培养基为高糖 DMEM 中添加 1% 双抗 (青霉素 100 U/mL + 链霉素 100  $\mu$ g/mL)、1% 丙酮酸钠 (11.0 mg/mL)、1% 非必需氨基酸、10% 胎牛血清。转染前一天将培养的细胞分散至 60 mm 平皿, 加无双抗培养基 5 mL 培养, 同时添加 10  $\mu$ mol/L 亚油酸 (LA, 18:2n-6)。待其生长至 90% 左右汇合时用于转染。转染操作按照脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 说明书进行, 转染时实验组为质粒 pcDNA3.1-F2F1-E5E2+pcDNA3.1-sD15-sEgD4 (两个质粒等比例混合), 对照组为质粒 pcDNA3.1-EGFP, 两组各为 8  $\mu$ g。转染后 48 h, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 收集备用。

### 1.2.3 RT-PCR 鉴定目的基因的超表达

取上述收集的细胞 1/3 用于 RT-PCR 实验。总 RNA 提取和 RT-PCR 实验均按照宝生物工程 (大连) 有限公司相关试剂说明书进行。简言之,

总 RNA 提取之后先进行定量测定各样品含量, 然后将总 RNA 中的 mRNA 反转录成为 cDNA, 每个样品取 2  $\mu$ L 反转录产物用于 PCR 检测, 每个 PCR 反应体系为 25  $\mu$ L。PCR 中使用的目的基因表达检测引物见表 1 (其中引物 ActD-s 和 ActD-a 用于检测内参基因  $\beta$ -actin)。

PCR 反应结束后, 取 5  $\mu$ L 进行电泳检测, 观察基因表达情况。

表 1 PCR 实验中使用的引物

Table 1 Primers used in PCR experiments.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Size (bp)
Fd2D-s	TTCGGGAGAAGATGCTAC GGATG	65.3	
Fd2D-a	AAGGCTGTGACGAGGGT AGGAATC	65.0	309
Fd1D-s	TCGGGAGGGAAAAGAAG AAGCAC	65.9	
Fd1D-a	GTGAAGGTAAGCGTCCAA CCAGAG	64.3	584
Ev5D-s	ACCTTGACTCACACTGC TGTCTCTG	66.0	
Ev5D-a	TGGTGGTCCTTCAGGTGG TCTTTC	66.3	604
Ev2D-s	TGTGTCTTGAAGTGGATA CCTTGTGG	64.4	
Ev2D-a	AAAACCATTCTTCACTTC TTTCCCTG	63.8	363
sD15-s	ACGTGAACGCCAACACC AAGC	65.4	
sD15-a	ACACGCCCATGAAGATGT TCCAC	65.7	235
sEgD4-s	TCATCATCAACCACATCA GCGAG	63.2	
sEgD4-a	TTTAGCTCTTCTGTGCGCC GTTG	63.8	426
ActD-s	CTGAGAGGGAAATCGTGC GTGAC	65.7	
ActD-a	TGCCACAGGATTCCATAC CCAAG	65.5	210

### 1.2.4 脂肪酸的提取与 GC-MS 分析

取上述收集的细胞余下的 2/3 用于脂肪酸提取：用去离子水漂洗 3 次，1 000 r/min 离心 5 min，加入 1 mL 2.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/甲醇溶液，轻轻混匀，80 °C 水浴 90 min，待冷却至室温，加入 1.5 mL 0.9% NaCl 溶液和 1 mL 正己烷，剧烈振荡混匀，3 000 r/min 离心 5 min，将脂肪酸萃取到有机相中，吸取上清经氮气吹干浓缩后 -80 °C 保存备用。GC-MS 检测时可添加适量的正己烷稀释，使用仪器为安捷伦气质联用仪 HP-5890/HP-5971。检测使用参数参考 Kang 等的报道<sup>[20]</sup>。

### 1.3 统计分析

脂肪酸含量等结果采用  $\bar{x} \pm s$  (算术平均值  $\pm$  标准偏差) 表示。组间数据比较采用 Student's *t*-test，以  $P < 0.05$  作为统计学差异显著性的判断标准。每一种脂肪酸百分含量按其峰面积除以表 2 中所列所有脂肪酸峰面积总和而计算获得。

## 2 结果与分析

### 2.1 6 个外源基因在哺乳动物细胞中的表达或超表达

将多基因表达载体 pcDNA3.1-F2F1-E5E2 和双基因表达载体 pcDNA3.1-sD15-sEgD4 共同用于转染哺乳动物细胞 NHK293，转染时利用 pcDNA3.1-EGFP 质粒作为对照，其绿色荧光可以比较准确地反映转染效率。转染后第二天观察细胞，可以看到对照组的绿色荧光，在转染后 48 h 绿色荧光基本达到最强的状态，约 90% 以上细胞被成功转染。此时收集细胞提取总 RNA 进行 RT-PCR 分析，结果表明转染了

pcDNA3.1-F2F1-E5E2 和 pcDNA3.1-sD15-sEgD4 的细胞中，*Fads2*, *Fads1*, *Elovl5*, *Elovl2*, *sD15* 和 *sEgD4* 均成功表达 (或超表达) (图 1)。

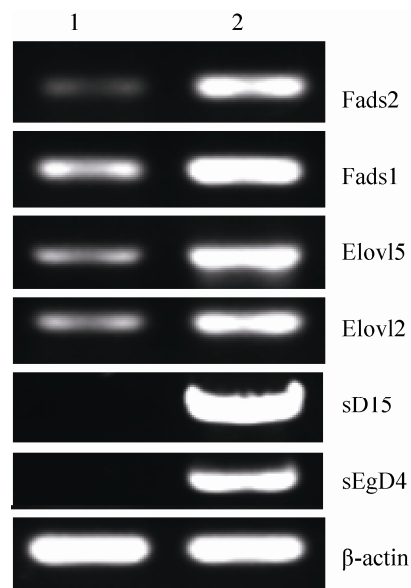


图 1 RT-PCR 检测转染后细胞中目的基因的转录水平

Fig. 1 Analysis of transcripts in transfected cells by RT-PCR. 1: cells transfected with pcDNA3.1-EGFP; 2: cells transfected with pcDNA3.1-F2F1-E5E2+pcDNA3.1-Sd15-sEgD4.

### 2.2 外源基因的超表达提高细胞中 LA (18:2n-6) 向 DHA (22:6n-3) 转化的能力

通过 RT-PCR 实验确认 6 个目的基因均获得超表达后，提取细胞中的脂肪酸，并利用 GC-MS 进行分析，结果如图 2 所示。色谱图中横坐标为各种脂肪酸出现的保留时间，不同的脂肪酸出现的时间不一样，由此可以将各种脂肪酸在色谱图中分别开来，再通过质谱分析和搜库对比就可以准确判定各个色谱峰所代表的不同脂肪酸的具体种类。各个色谱峰的高低则表明此

脂肪酸的含量,按照其峰面积计算出它的含量,进而可计算出每一种脂肪酸的百分含量(表2)。这些数据表明,与转染对照质粒 pcDNA3.1-EGFP 的细胞相比,同时转染 pcDNA3.1-F2F1-E5E2 和 pcDNA3.1-sD15-sEgD4 质粒的细胞中, *Fads2*, *Fads1*, *Elovl5*, *Elovl2*, *sD15* 和 *sEgD4* 这 6 个目的基因的表达(或超表达)显著地促使 LA (18:2n-6) 向长链多不饱和脂肪酸的生物合成方向转化。对图 1 和表 2 分析可知,一部分 LA (18:2n-6) 被  $\Delta 15$  去饱和酶转化为 ALA (18:3n-3), 然后在  $\Delta 6$  和  $\Delta 5$  脂肪酸去饱和酶以及  $\Delta 6$  和  $\Delta 5$  脂肪酸延长酶的交替作用下,按照  $\omega-3$  代谢途径合成其下游长链的  $\omega-3$  多不饱和脂肪酸如 EPA (20:5n-3) 和 DPA (22:5n-3) 接着被  $\Delta 4$  脂肪酸去饱和酶直接转化为 DHA

(22:6n-3); 另一部分 LA (18:2n-6) 可以在  $\Delta 6$  和  $\Delta 5$  脂肪酸去饱和酶以及  $\Delta 6$  和  $\Delta 5$  脂肪酸延长酶的交替作用下,按照  $\omega-6$  代谢途径合成 20:3n-6 和 20:4n-6, 同时,这些产物还可以被  $\Delta 15$  去饱和酶转化为 20:4n-3 (未检测到) 和 20:5n-3, 继而进入  $\omega-3$  代谢途径,直至合成 DHA。总体看来,实验组细胞与对照组相比较,添加的 LA 显著下降,而  $\omega-3$  系的多不饱和脂肪酸如 ALA (18:3n-3)、EPA (20:5n-3)、DPA (22:5n-3) 和 DHA (22:6n-3) 的含量均显著升高,其中 DHA (22:6n-3) 的含量从 16.74% 提高到 25.3%。此外,本研究结果还表明,6 个目的基因的表达或超表达显著降低了  $\omega-6$  与  $\omega-3$  多不饱和脂肪酸之间的比率,即从对照组的 1.85 降至实验组的 0.84。

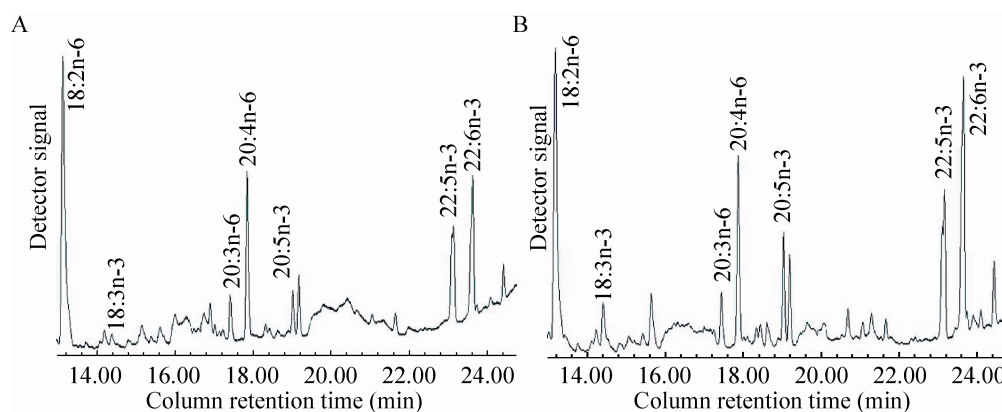


图 2 转染 pcDNA3.1-EGFP (A) 或 pcDNA3.1-F2F1-E5E2+pcDNA3.1-sD15-sEgD4 (B) 质粒的 HEK293T 细胞中多不饱和脂肪酸的色谱图(局部)

Fig. 2 Partial gas chromatograph traces of PUFA from HEK293T cells transfected with pcDNA3.1-EGFP (A) and the HEK293T cells transfected with pcDNA3.1-F2F1-E5E2+pcDNA3.1-sD15-sEgD4 (B).

表 2 转染 pcDNA3.1-EGFP 或 pcDNA3.1-F2F1-E5E2+ pcDNA3.1-sD15-sEgD4 质粒的 HEK293T 细胞中多不饱和脂肪酸的组成及含量变化

Table 2 PUFA composition from the HEK293T cells transfected with pcDNA3.1-EGFP and the HEK293T cells transfected with pcDNA3.1-F2F1-E5E2+ pcDNA3.1-sD15-sEgD4

Fatty acids	EGFP (%)	F2F1-E5E2+sD15-sEgD4 (%)
$\omega$ -6 Polyunsaturates		
18:2n-6	39.29±2.15 <sup>a</sup>	23.76±1.90 <sup>b</sup>
20:3n-6	5.65±0.71	5.11±0.67
20:4n-6	19.96±1.92	17.05±1.88
Total	64.90±4.13 <sup>a</sup>	45.92±3.27 <sup>b</sup>
$\omega$ -3 Polyunsaturates		
18:3n-3	1.61±0.20 <sup>b</sup>	4.54±0.38 <sup>a</sup>
20:5n-3	5.64±0.62 <sup>b</sup>	9.66±0.83 <sup>a</sup>
22:5n-3	11.10±0.97 <sup>b</sup>	14.64±1.01 <sup>a</sup>
22:6n-3	16.74±1.24 <sup>b</sup>	25.30±1.32 <sup>a</sup>
Total	35.09±3.46 <sup>b</sup>	54.14±4.84 <sup>a</sup>
$\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio	1.85±0.31 <sup>a</sup>	0.84±0.25 <sup>b</sup>

Notes: values are means of three measurements; values for each fatty acid with different superscript differ significantly ( $P < 0.05$ ) between control (EGFP) and F2F1-E5E2+sD15-sEgD4.

### 3 讨论

如何获取丰富的 DHA 等长链多不饱和脂肪酸资源是当今世界范围内人们所关心的一个问题。相关的研究显示,通过转基因动物技术在哺乳动物中生产这些长链多不饱和脂肪酸是有可能的。1997 年, Spychalla 等从线虫 *C. elegans* 中筛选克隆了第一个动物  $\Delta$ 15 去饱和酶(通常也称为  $\omega$ -3 去饱和酶)基因,命名为 *fat-1*<sup>[21]</sup>,在后续的研究发现 *fat-1* 基因可以将 16–20 碳  $\omega$ -6 PUFAs 去饱和变成  $\omega$ -3 PUFAs。Kang 等将 *fat-1* 基因转入哺乳动物细胞,  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 PUFAs 比从 15:1 下降到 1:1,使哺乳动物中的  $\omega$ -3 PUFAs 含量显著提高<sup>[20]</sup>。之后又于 2004 年将 *fat-1* 基因转入小鼠,使得 ALA、EPA、

DPA 等  $\omega$ -3 PUFAs 均显著提高<sup>[22]</sup>。2006 年, Lai 等制备的 *fat-1* 的转基因猪,也表现出了与转基因小鼠类似的情况<sup>[23]</sup>。然而,这些转基因动物体内所合成的  $\omega$ -3 PUFAs 中以 18C 和 20C 的  $\omega$ -3 PUFAs 为主,而更为重要的 22C 的 DHA 总量仍然很少。事实上,后续的一些研究表明 *fat-1* 的  $\Delta$ 15 去饱和酶活性并不能增加这些动物体内的 DHA 含量。因此, *fat-1* 基因在用于提高哺乳动物长链多不饱和脂肪酸含量的实践中,关键性的缺憾就是不能增加 DHA 的含量。

在哺乳动物中,阻碍 DHA 高效生物合成的原因大概有 3 个:一是  $\Delta$ 6 和  $\Delta$ 5 脂肪酸去饱和酶以及  $\Delta$ 6 和  $\Delta$ 5 脂肪酸延长酶的活性可能受到某种机制的抑制,尤其是  $\Delta$ 6 脂肪酸去饱和酶的活性。 $\Delta$ 6 脂肪酸去饱和酶基本上是被公认的在

哺乳动物长链多不饱和脂肪酸的生物合成过程中的第一个限速酶<sup>[24]</sup>。针对这一原因,我们前期研究将上述4种酶在HEK293T细胞中进行超表达研究,结果证实了哺乳动物自身形成了某种平衡机制,抑制长链多不饱和脂肪酸如DHA、ARA等的大量的高水平合成,但是通过对 $\Delta 6$ 和 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶以及 $\Delta 6$ 和 $\Delta 5$ 脂肪酸延长酶的超表达,能够打破哺乳动物这种平衡机制,从而显著提高DHA、ARA等的合成水平。二是哺乳动物缺失 $\Delta 15$ 脂肪酸去饱和酶活性,不能将体内摄入的 $\omega-6$ 多不饱和脂肪酸转化为合成DHA的前体脂肪酸如EPA和DPA等。人类食品以及动物饲料脂肪酸中通常含有大量的亚油酸(LA,18:2n-6),并由此合成花生四烯酸(AA,20:4n-6)等 $\omega-6$ 系多不饱和脂肪酸,而 $\omega-3$ 系多不饱和脂肪酸含量很低,例如在西方人体 $\omega-6$ 与 $\omega-3$ 系多不饱和脂肪酸的比率通常高达10-20,这种比率的失衡不利于身体健康<sup>[25]</sup>。上文中所提及的线虫*C. elegans*的 $\Delta 15$ 去饱和酶活性被引入动物或动物细胞后就能够将 $\omega-6$ 系多不饱和脂肪酸转化为 $\omega-3$ 系多不饱和脂肪酸,从而改变两者之比率。三是哺乳动物在 $\omega-3$ 长链多不饱和脂肪酸生物合成途径中从DPA转化为DHA这一环节的低效性,即“Sprecher”通路对高效转化DPA为DHA的具有某种制约性。但是在自然界中,一些生物,例如一种原生动物小眼虫*Euglena gracilis*、海洋真菌破囊壶菌*Thraustochytrium*和巴夫藻*Pavlova lutheria*,在合成DHA时并不需要经过“Sprecher通路”,而是直接利用 $\Delta 4$ 去饱和酶活性将DPA转化成为DHA,因此这类生物中DHA含量一般比较高<sup>[26-28]</sup>。前面提及*fat-1*基因在哺乳动物中表达后能够生成很高水平的DPA,但不能进一步转

化成为DHA。我们前期研究已经证实,源自于小眼虫*Euglena gracilis*  $\Delta 4$ 去饱和酶活性正好可以与*fat-1*基因(我们研究中所用的sD15与之同源,但进行了密码子优化)配合,将累积的DPA直接转化成为DHA。

本研究正是致力于解决上述阻碍DHA高效生物合成的3个因素或环节,目标是使哺乳动物细胞甚至是哺乳动物个体通过遗传改造后能够高效地利用自然界大量存在的亚油酸(LA,18:2n-6),将其转化为DHA(22:6n-3),使动物脂肪变成对人体健康有益成为可能。此项研究明确证实, $\Delta 6$ 和 $\Delta 5$ 脂肪酸去饱和酶、 $\Delta 6$ 和 $\Delta 5$ 脂肪酸延长酶以及 $\Delta 15$ 和 $\Delta 4$ 脂肪酸去饱和酶这6种酶活性在哺乳动物细胞中的表达或超表达显著地提高了这种转化能力,既能够将 $\omega-6$ 系多不饱和脂肪酸转化为 $\omega-3$ 系多不饱和脂肪酸,又能够将短链的LA或ALA转化为长链的ARA、EPA、DPA等,最后还能将细胞中积累的DPA直接转化为DHA。可以说,这种思路是在哺乳动物及其细胞中将LA(18:2n-6)代谢转化为DHA(22:6n-3)的最佳转基因组合。当然,多个目的基因用于制作转基因动物将变得更加困难,还需要解决一些技术问题。

我们的研究以及技术路线除了为将来改造陆地型动物以提供DHA等长链多不饱和脂肪酸提供理论和数据支持外,还可以将其应用于DHA等长链多不饱和脂肪酸生物学功能的相关基础研究中,因为这种转基因动物本身就是一个很好的动物模型。因此,本研究不仅具有潜在的实践应用价值,也为相关理论研究奠定了基础。



## REFERENCES

- [1] Vaughan VC, Hassing MR, Lewandowski PA. Marine polyunsaturated fatty acids and cancer therapy. *Br J Cancer*, 2013, 108(3): 486–492.
- [2] Rogers LK, Valentine CJ, Keim SA. DHA supplementation: current implications in pregnancy and childhood. *Pharmacol Res*, 2013, 70(1): 13–19.
- [3] Catalan J, Moriguchi T, Slotnick B, et al. Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats. *Behav Neurosci*, 2002, 116(6): 1022–1031.
- [4] Innis SM. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev Neurosci*, 2000, 22(5/6): 474–480.
- [5] Birch EE, Garfield S, Castaneda Y, et al. Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age in a double-blind, randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula. *Early Hum Dev*, 2007, 83(5): 279–284.
- [6] Moriguchi T, Greiner RS, Salem NJr. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J Neurochem*, 2000, 75(6): 2563–2573.
- [7] Lim GP, Calon F, Morihara T, et al. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci*, 2005, 25(12): 3032–3040.
- [8] Rose DP, Connolly JM, Rayburn J, et al. Influence of diets containing eicosapentaenoic acid on growth and metastasis of breast cancer cells in nude mice. *J Nat Cancer Inst*, 1995, 87(8): 587–592.
- [9] Gonzalez MJ, Schemmel RA, Dugan L Jr, et al. Dietary fish oil inhibits human breast carcinoma growth: a function of increased lipid peroxidation. *Lipids*, 1993, 28(9): 827–832.
- [10] Ruxton CH, Reed SC, Simpson MJ, et al. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet*, 2004, 17(5): 449–459.
- [11] Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(20): 2047–2067.
- [12] Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 2004: 181–204.
- [13] Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1486(2/3): 219–231.
- [14] Emken EA, Adlof RO, Gulley RM. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1213(3): 277–288.
- [15] Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, et al. Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res*, 2001, 42(8): 1257–1265.
- [16] Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, et al. Long-chain conversion of [<sup>13</sup>C]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *J Lipid Res*, 2005, 46(2): 269–280.
- [17] Zhu GM, Saleh AAM, Bahwal SA, et al. Overexpression of four fatty acid synthase genes elevated the efficiency of long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis in mammalian cells. *Chin J Biotech*, 2014, 30(9): 1464–1472 (in Chinese).  
朱贵明, Saleh AAM, Bahwal SA, 等. 四个脂肪酸合成酶基因在哺乳动物细胞中的超表达提高长链多不饱和脂肪酸生物合成效率. *生物工程学报*, 2014, 30(9): 1464–1472.
- [18] Zhu GM, Ou Q, Zhang T, et al. A more desirable balanced polyunsaturated fatty acid composition achieved by heterologous expression of  $\Delta 15/\Delta 4$  desaturases in mammalian cells. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e84871.
- [19] Wang KF, Zhu GM, Zhang L, et al. Construction of fatty acid synthesis enzymes multigene

- expression vector. *Chin J Gerontol*, 2013, 33(17): 4178–4180 (in Chinese).
- 汪坤福, 朱贵明, 张莉, 等. 脂肪酸合成酶系多基因表达载体的构建. *中国老年学杂志*, 2013, 33(17): 4178–4180.
- [20] Kang ZB, Ge Y, Chen Z, et al. Adenoviral gene transfer of *Caenorhabditis elegans* n-3 fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 98(7): 4050–4054.
- [21] Spathak JP, Kinney AJ, Browse J. Identification of an animal n-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(4): 1142–1147.
- [22] Kang JX, Wang J, Wu L, et al. Transgenic mice Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature*, 2004, 427(6974): 504.
- [23] Lai L, Kang JX, Li R, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(4): 435–436.
- [24] Tocher DR, Leaver MJ, Hodgson PA. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturase. *Prog Lipid Res*, 1998, 37(2/3): 73–117.
- [25] Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol*, 2011, 44(2): 203–215.
- [26] Meyer A, Cirpus P, Ott C, et al. Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena gracilis*: biochemical and molecular evidence for the involvement of a  $\Delta^4$ -fatty acyl group desaturase. *Biochemistry*, 2003, 42(32): 9779–9788.
- [27] Tonon T, Harvey D, Larson TR, et al. Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid  $\Delta^4$ -desaturase from the microalga *Pavlova lutheri*. *FEBS Lett*, 2003, 553(3): 440–444.
- [28] Qiu X, Hong H, MacKenzie SL. Identification of a  $\Delta^4$  fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. *J Biol Chem*, 2001, 276(34): 31561–31566.

(本文责编 陈宏宇)