

研究报告

转 sFat-1 基因猪肉对小鼠血常规血生化及免疫指标的影响

宋鹏坤¹, 张坚¹, 王春荣¹, 李丽祥¹, 满青青¹, 汤茂学², 崔文涛²

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094)

摘要:目的 评价转 sFat-1 基因猪肉对小鼠血常规、血生化及免疫指标的影响。方法 以转 sFat-1 基因猪肉、普通猪肉为受试物, 配成配合饲料后分别设立低、高 2 个剂量组和基础饲料对照组, 经口喂饲小鼠 30 天后, 比较各组小鼠血常规、血生化、免疫球蛋白和外周血 T 淋巴细胞比例。结果 同性别的各组血常规和免疫球蛋白指标差异均无统计学意义; 转 sFat-1 基因猪肉高剂量组血清 BUN 浓度与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 雌性小鼠中, 转 sFat-1 基因猪肉低剂量组的 $CD3^+CD4^+$ 细胞比例、转 sFat-1 基因猪肉高剂量组的 $CD3^+CD8^+$ 细胞比例与普通猪肉低剂量组相应指标比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 在本研究的剂量下, 未发现转 sFat-1 基因猪肉对小鼠血常规、血生化和免疫指标有影响。

关键词: 免疫球蛋白; 转 sFat-1 基因猪肉; 淋巴细胞; 血常规; 血生化; EPA; DHA

中图分类号: R151.3; TS201.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)02-0140-05

Influences of sFat-1 transgenic pork on the blood routine and biochemical and immune indicators of mice

Song Pengkun, Zhang Jian, Wang Chunrong, Li Lixiang, Man Qingqing, Tang Maoxue, Cui Wentao
(National Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To evaluate the influence of sFat-1 transgenic pork on the blood routine and biochemical and immune indicators of mice. **Methods** Granular compound feed with low and high dosage of sFat-1 transgenic pork or pork control and basal feed control were administered orally to five groups of mice respectively for 30 days. Blood routine and biochemical indicators, immunoglobulin and the percentage of lymphocytes in peripheral blood were observed. **Results** There was no significant difference between the five groups on blood routine and immunoglobulin; the serum BUN concentration was significantly higher in high-dosage sFat-1 transgenic pork group than control group in both male and female ($P < 0.05$); the percentage of lymphocytes ($CD3^+CD4^+$) in peripheral blood of female was significantly higher in low-dosage sFat-1 transgenic pork group than low-dosage pork control group ($P < 0.05$), while the percentage of lymphocytes ($CD3^+CD8^+$) of female mice was significantly higher in high-dosage sFat-1 transgenic pork group than low-dosage pork control group ($P < 0.05$). **Conclusion** There was no influence of sFat-1 transgenic pork on blood routine and biochemical and immune indicators of mice at the given dosage in the study.

Key words: Immunoglobulin; sFat-1 transgenic pork; lymphocyte; blood routine; blood biochemistry; EPA; DHA

以 EPA 和 DHA 为代表的 ω -3 多聚不饱和脂肪酸 (ω -3 PUFAs) 对人体健康, 如维护正常神经视觉系统发育^[1]、预防心脑血管疾病^[2]、调节免疫系统^[3]等十分重要。富含 ω -3 PUFAs 食物主要是三文鱼等深海鱼产品, 猪肉中 ω -3 PUFAs 含量较少。

利用转基因技术在猪基因组中导入 ω -3 多聚不饱和脂肪酸去饱和酶 (sFat-1) 基因, 可提高猪肉中的 ω -3 PUFAs 含量, 增加 EPA 和 DHA 的食物来源。本研究旨在比较转 sFat-1 基因猪肉与普通猪肉脂肪酸成分变化和对小鼠基本指标如血常规、血生化和免疫指标的影响, 为转基因猪肉的营养学评价提供一定的科学依据。

收稿日期: 2012-12-06

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2011ZX08011-005)

作者简介: 宋鹏坤 女 助理研究员 研究方向为营养与食品安全
E-mail: spk_8210@yahoo.com.cn

通信作者: 张坚 男 研究员 研究方向为营养与食品安全
E-mail: zhjian6708@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 受试物

转 sFat-1 基因猪肉和普通猪肉由中国农业科学

院北京畜牧兽医研究所提供^[4]。上述两种受试物经冷冻干燥粉碎后与小鼠繁殖料(AIN—93G)按照实验设计要求混合,制备成含有不同剂量受试物的试验饲料。

1.1.2 仪器与试剂

威图 2000 全自动生化仪、低温高速离心机、流式细胞仪(美国 BD 公司)、ABX Micros 60 全自动血细胞分析仪、索泰脂肪提取器、冷冻干燥机、气相色谱仪(岛津 GC14B 型)。

血生化检测试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司); FITC-anti-CD3、PE-anti-CD4、PerCP-anti-CD8 荧光抗体(均购于 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 试验动物与分组

昆明种小鼠,6~8 周龄,体重 18~22 g,购于中国药品生物制品检定所实验动物中心[SPF 级,动物合格证号:SCXK-(京)2009-0017];颗粒饲料购于北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK-(京)2009-0008];饲养于中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所[SPF 级,合格证号:SYXK-(京)2009-0032],室温(22±2)℃,湿度 60%~80%。

试验配合饲料的配比参照中国营养学会膳食指南中关于动物性食物推荐摄入量折算成小鼠每日受试物剂量。动物在实验室条件下检疫一周后,按体重分层随机将 100 只昆明种小鼠分成 5 组,每组 20 只,雌雄各半,分别喂饲基础饲料(对照组)、低剂量普通猪肉饲料、高剂量普通猪肉饲料、低剂量转 sFat-1 基因猪肉饲料、高剂量转 sFat-1 基因猪肉饲料。每周称重小鼠体重以调整喂饲量,连续喂养 30 天。

1.2.2 测定指标

动物处死前眼眶内眦取血,EDTA-K2 抗凝血用于测定血常规和外周 T 淋巴细胞亚群比例,离心获取血清用于血生化和免疫球蛋白测定。

血常规检测:动物处死前眼眶内眦静脉取血,EDTA-K2 抗凝血 20 μl,测定血常规指标,包括白细胞(WBC),红细胞(RBC),血红蛋白(HB),红细胞

平均体积(MCV),红细胞体积分布宽度(RDW),血小板计数(PLT),嗜中性粒细胞绝对值(GRAN),淋巴细胞绝对值(LYM),单核细胞绝对值(MON),嗜中性粒细胞百分数(GRA%),淋巴细胞百分数(LYM%),单核细胞百分比(MON%)。

血生化及免疫球蛋白检测:动物处死前眼眶内眦静脉取血,凝固后 4 000 r/min 离心 10 min,分离血清。测定谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、IgE、IgG、IgM、IgA 等免疫球蛋白。

外周血 T 淋巴细胞亚群比例检测:动物处死前眼眶内眦静脉取血,EDTA-K2 抗凝血 20 μl,每只设定 3 支流式试管进行测定。分别在管中加入 CD3/CD4/CD8 不同荧光素标记的单克隆小鼠抗体。每管加入 2 ml FACS 红细胞裂解液,室温下避光保存 20 min。1 200 r/min 离心 5 min,弃去上清液。每管再加入 2 ml PBS,1 200 r/min 离心 5 min,弃去上清液。加入 0.5 ml PBS 混匀后上流式细胞仪进行检测。

1.3 统计分析

采用 SAS 9.1 统计软件进行单因素方差分析并同时组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组饲料中受试物掺入量、脂肪、脂肪酸含量、 ω -6 和 ω -3 PUFAs 构成比结果

由表 1 可见,普通猪肉和转 sFat-1 基因猪肉的脂肪含量相差近 1 倍,配合饲料中各组脂肪含量、饱和脂肪酸(SFA)、单不饱和脂肪酸(MUFA)、多不饱和脂肪酸(PUFA)比例也接近。相对于不同猪肉组,转 sFat-1 基因猪肉高剂量组饲料中 ω -3 PUFAs 含量有所增加, ω -6/ ω -3 降低。转 sFat-1 基因猪肉高剂量组饲料脂肪中 EPA 和 DHA 含量高于其它组。

2.2 血常规结果

由表 2 可见,各组不同性别血常规指标经方差分析差异均无统计学意义。

表 1 各组饲料中受试物、脂肪、脂肪酸含量、 ω -6 和 ω -3 PUFAs 构成比

Table 1 The test material, fat and fatty acids contents, omega-six and omega-three PUFAs ratio in different groups

组别	受试物 (g/100 g)	受试物冻干样 脂肪含量 (g/100 g)	配合饲料 脂肪含量 (g/100 g)	配合饲料脂肪酸构成比(%)			配合饲料 ω -6 和 ω -3 PUFAs 构成比(%)			
				SFA	MUFA	PUFA	ω -6	ω -3	EPA 和 DHA	ω -6/ ω -3
对照组	0.0	0.0	6.8	21.4	36.5	39.9	38.4	1.4	0.00	28.4
普通猪肉低剂量组	1.0	12.0	7.2	20.8	36.7	39.9	38.4	1.4	0.10	27.1
普通猪肉高剂量组	25.0	12.0	7.2	24.7	38.3	33.4	32.0	1.2	0.08	26.2
转 sFat-1 基因猪肉低剂量组	1.0	22.1	7.2	20.9	36.1	40.1	38.4	1.5	0.13	25.2
转 sFat-1 基因猪肉高剂量组	25.0	22.1	7.0	22.6	36.9	37.7	36.0	1.5	0.31	23.3

注:统计方法为方差分析。

2.3 生化指标及免疫球蛋白结果

表3显示雄性小鼠血清BUN浓度普通猪肉高剂量组和转sFat-1基因猪肉高剂量组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),雌性小鼠血清BUN浓度转sFat-1基因猪肉高剂量组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。其它各项生化指标及免疫球蛋白各对应剂量组之间同性别比较差异无统计学意义。

2.4 各组全血T淋巴细胞亚群比例的比较

与基础饲料组相比,雄性小鼠各试验组 $CD3^+CD4^+$ 细胞占比、 $CD3^+CD8^+$ 细胞占比、 $CD4^+/CD8^+$ 差异均无统计学意义;但雌性小鼠中,转sFat-1基因猪肉低剂量组的 $CD3^+CD4^+$ 细胞比例、转sFat-1基因猪肉高剂量组的 $CD3^+CD8^+$ 细胞比例与普通猪肉低剂量组相应指标比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表4 全血T淋巴细胞亚群比例($\bar{x} \pm s$)

Table 4 The percentage of lymphocytes in peripheral blood in different groups

组别	$CD3^+CD4^+$ (%)	$CD3^+CD8^+$ (%)	$CD4^+/CD8^+$
雄性			
对照组	42.1 ± 11.0	23.4 ± 4.8	1.9 ± 0.8
普通猪肉低剂量组	44.8 ± 6.9	20.4 ± 5.1	2.3 ± 0.7
普通猪肉高剂量组	43.6 ± 11.8	18.8 ± 5.6	2.5 ± 0.9
转sFat-1基因猪肉低剂量组	49.2 ± 8.4	19.4 ± 4.5	2.7 ± 0.9
转sFat-1基因猪肉高剂量组	48.3 ± 5.9	19.7 ± 4.1	2.5 ± 0.6
雌性			
对照组	39.3 ± 6.7	16.0 ± 4.2	2.6 ± 0.7
普通猪肉低剂量组	33.1 ± 6.5	14.9 ± 2.2	2.3 ± 0.6
普通猪肉高剂量组	38.4 ± 7.4	19.1 ± 5.1	2.2 ± 1.0
转sFat-1基因猪肉低剂量组	43.6 ± 4.8 ^a	18.4 ± 6.1	2.7 ± 1.1
转sFat-1基因猪肉高剂量组	36.6 ± 8.5	21.8 ± 5.6 ^a	1.8 ± 0.5

注:统计方法为方差分析,a与普通猪肉低剂量组比较 $P < 0.05$ 。

3 讨论

猪肉是人类重要的动物性食品,通过转基因技术提高猪肉中 $\omega-3$ PUFAs不仅有益于身体健康,还能提高猪肉的嫩度和风味^[5]。限于转sFat-1基因猪肉受试物较难获得,我们在本试验中主要对两种猪肉在脂肪酸成分和对小鼠的一般指标是否有不同影响两方面进行了探索性研究。

研究表明,对于维持细胞稳态和正常生长起关键作用的不仅仅是 $\omega-6$ 、 $\omega-3$ PUFAs的含量,更在于二者的比例。本研究所用转sFat-1基因猪肉粗脂肪含量、EPA和DHA含量约为普通猪肉的2倍和10倍, $\omega-6/\omega-3$ 也低于普通猪肉。但与三文鱼相比,仍然不能作为最佳的 $\omega-3$ PUFAs膳食来源。如要达到世界卫生组织(WHO)、粮农组织(FAO)、国际脂肪

酸研究会(ISSFAL)、美国心脏学会(AHA)等机构EPA和DHA推荐量(如AHA提出的推荐量为500 mg),每天至少需要食用380 g转sFat-1基因猪肉才能达到推荐量,而只要吃25 g三文鱼就能达到最低推荐量,因此,从技术层面上讲还需进一步提高sFat-1基因表达以产生更多的 $\omega-3$ PUFAs。

通过分析小鼠血常规、血生化及免疫球蛋白等,发现除BUN外各组差异均无统计学意义,说明食用转sFat-1基因猪肉并未对小鼠主要血液指标产生不良影响。BUN是人体蛋白质代谢的主要终末产物,肾脏是尿素的主要排泄器官。高剂量组中转sFat-1基因猪肉的比例达25%,猪肉蛋白质含量达70%以上,因此可能会加重小鼠肾脏代谢蛋白质的负担,即使BUN在正常水平也可能预示着肾脏轻微损伤。结合这个指标我们分析转sFat-1基因猪肉可能会对小鼠肾组织造成一定程度的影响,但还需进行组织病理学检查做进一步的验证。

外周血T淋巴细胞根据其表面表达的CD分子的不同,分为 $CD4^+$ 细胞和 $CD8^+$ 细胞两大亚群。正常的免疫应答有赖于各免疫细胞,尤其是T细胞亚群之间的相互制约,以形成适度的免疫应答,使机体在此过程既能清除抗原性物质,又不损伤自身组织。免疫功能的紊乱,常常是由于各T细胞亚群之间的不平衡造成的^[6]。 $CD4^+/CD8^+$ 值较高时,表明机体处于较好的免疫状态,而当 $CD4^+/CD8^+$ 失调或缺陷时,可导致各种免疫疾病如恶性肿瘤、遗传性免疫缺陷病等等发生。本研究发现转sFat-1基因猪肉组和普通猪肉低剂量组相对雌性小鼠 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 细胞比例差异有统计学意义,但与对照组相比差异均无统计学意义,原因可能在于雌、雄小鼠本身的免疫应答存在差异,郑国强等发现雌性小鼠的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 单阳性细胞低于雄性小鼠^[7],另外,尽管饲料配制按照国内外实验动物饲料的推荐标准来进行,但由于猪肉受试物本身是一种含有多种营养成分的食物,其添加会引起饲料中的营养素出现不平衡,普通猪肉和转sFat-1基因猪肉的营养成分及含量存在差异,如蛋白质含量不同(转sFat-1基因猪肉比普通猪肉的蛋白质含量低,而脂肪含量高)、脂肪酸谱改变(转sFat-1基因猪肉比普通猪肉含更高的 $\omega-3$ PUFAs)等,故可能影响了动物的敏感性^[8]。

本研究旨在探讨转sFat-1基因猪肉与普通猪肉的脂肪酸成分变化是否会对小鼠的一些基本指标造成影响,研究结果显示转sFat-1基因猪肉未对小鼠血常规、白生化和免疫指标产生影响。但是由于受试物较难获得,本研究采用了30天小鼠喂养实