

## 日粮不同 $n-3/n-6$ PUFA 对产蛋鸡脾脏组织 白介素 2 水平及 干扰素基因表达的影响

夏兆刚 于明

(中国农业大学 动物科技学院,北京 100094)

**摘要** 选用 60 只 40 周龄的产蛋鸡研究在日粮中添加多不饱和脂肪酸(PUFA)比例对产蛋鸡脾脏组织白细胞介素 2(IL-2)水平、单核细胞膜脂质脂肪酸组成以及 干扰素(IFN $\gamma$ )基因表达的影响。结果表明脾脏 IL-2 水平随着日粮中  $n-3/n-6$  比值的下降显著增加( $P < 0.10$ )。脾脏单核细胞膜脂质脂肪酸组成和比例能够反映日粮 PUFA 的组成和比例。脾脏组织 IFN $\gamma$  的 mRNA 表达量受到日粮中 PUFA 比例的影响,高比例  $n-3/n-6$  日粮能够降低 IFN $\gamma$  的 mRNA 表达量。日粮不同 PUFA 比例有可能通过改变细胞因子基因表达以及免疫细胞膜脂质脂肪酸组成对机体的免疫功能产生影响。

**关键词** 产蛋鸡;多不饱和脂肪酸;白细胞介素-2;脾脏;干扰素基因表达

中图分类号 S 816.7

文章编号 1007-4333(2003)05-0093-05

文献标识码 A

### Effect of $n-3/n-6$ polyunsaturated fatty acid with different ratio on interleukin-2 level and IFN $\gamma$ - gene expression in spleen of laying hens

Xia Zhaogang, Guo Yuming

(College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** Sixty 40-week old laying hens were used to study the effect of dietary different ratio of  $n-3/n-6$  polyunsaturated fatty acid on Interleukin-2 Level, splenocyte membrane fatty acid composition and IFN $\gamma$  gene expression level in spleen of layers. Results showed that IL-2 level in spleen of laying hens fed diet with high  $n-3/n-6$  PUFA ratio was lower ( $P < 0.10$ ) than in laying hens fed with low  $n-3/n-6$  PUFA ratio. Splenocyte membrane fatty acid composition was affected by dietary PUFA composition. High  $n-3/n-6$  PUFA ratio decreased spleen IFN $\gamma$  mRNA level. These results suggest that different PUFA ratio modulate immune responses via influencing cytokine mRNA level and splenocyte membrane fatty acid composition.

**Key words** laying hens; polyunsaturated fatty acids; interleukin-2; IFN $\gamma$  mRNA

免疫系统担负着调节细胞间多种生理功能的任务,发挥这些重要调节功能的蛋白质之一就是细胞因子。当受到外界某种刺激时,T细胞、巨噬细胞和白细胞就会合成细胞因子,然后对有此受体的细胞起作用<sup>[1]</sup>。白细胞介素 2(IL-2)和 干扰素(IFN $\gamma$ )是动物体内免疫细胞所产生的 2 种重要的细胞因子。许多研究表明多不饱和脂肪酸(PUFA)尤其是  $n-3$  PUFA 能够调节小鼠细胞因子的产量<sup>[2~4]</sup>。但关于 PUFA 对家禽细胞因子生成及其调节机制方面的研究则没有报道。脾脏是禽类主要的免疫器

官,有关其对免疫功能的调节一直为人们所关注。本试验通过研究不同 PUFA 比例对产蛋鸡脾脏组织 IL-2 水平、单核细胞膜磷脂脂肪酸组成和比例以及 IFN $\gamma$  mRNA 基因表达,从不同方面探讨不同 PUFA 比例影响家禽免疫功能的机理。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验动物

60 只 40 周龄海兰褐产蛋鸡随机分为 3 个处理组,每个处理组设 6 个重复,每个重复 2 只鸡,采用

收稿日期:2003-07-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170689)

作者简介:夏兆刚,博士研究生;于明,博士,教授,联系作者,研究方向为家禽营养与免疫,guoyum@public.bta.net.cn

双层笼养,自由采食、饮水。试验期为5周。

### 1.2 试验日粮

本试验共使用3种日粮,以玉米-豆粕为基础日粮,对照组不添加脂肪,试验组日粮中添加的PUFA种类为鱼油和玉米油,二者总的添加量为6%, $n=3/$

$n=6$ 的比例分别为1:1和1:32。试验日粮中另补加日粮配制参照NRC(1994)家禽营养需要推荐营养水平。日粮原料组成及营养水平见表1,2种脂肪的脂肪酸组成见表2。

表1 试验日粮组成及营养水平

Table 1 Composition and nutrient level of diets

原料	对照 CK	VE 300 mg kg <sup>-1</sup>		原料	对照 CK	VE 300 mg kg <sup>-1</sup>	
		1:1	1:32			1:1	1:32
玉米	63.29	43.50	43.50	抗氧化剂	0.02	0.02	0.02
麸皮	0	8.00	8.00	微量元素预混物	0.20	0.20	0.20
豆粕	25.85	26.80	26.80	维生素预混物	0.02	0.02	0.02
沸石粉	0	4.70	4.70	营养水平			
鱼油	0	4.38	0	代谢能(MJ kg <sup>-1</sup> )	11.48	11.50	11.48
玉米油	0	1.62	6.00	粗蛋白/%	16.51	16.52	16.51
石粉	8.80	8.76	8.76	蛋氨酸/%	0.39	0.39	0.39
磷酸氢钙	1.35	1.40	1.40	赖氨酸/%	0.81	0.82	0.82
食盐	0.30	0.35	0.35	钙/%	3.50	3.50	3.50
蛋氨酸	0.12	0.14	0.14	非植酸磷/%	0.34	0.35	0.35
氯化胆碱	0.05	0.10	0.10				

注:饲料添加(mg kg<sup>-1</sup>): Cu 6、Fe 60、Mn 60、Zn 50、Se 0.15、I 0.35。

每kg加VA 10 800 IU、VD<sub>3</sub> 2 160 IU;(mg kg<sup>-1</sup>) VE 6.5、VK<sub>3</sub> 1.0、VB<sub>1</sub> 0.4、VB<sub>2</sub> 5、VB<sub>12</sub> 6、叶酸0.1、烟酸7、泛酸5。

### 1.3 采样及脾脏 IL-2 测定

试验结束时每个处理各取4只鸡称重,屠宰取样。

每g组织加1 mL磷酸缓冲液(pH 7.4),在冰水中匀浆。IL-2 放免试剂盒由解放军总医院科技开发中心放免研究所提供,按照其说明由中国农业科学院原子能研究所测定<sup>[5]</sup>。

表2 日粮中添加各种脂肪的脂肪酸组成

Table 2 Fatty acids composition of oils added to laying hens diets %

脂肪酸	原料	
	鱼油	玉米油
16:0	20.26	11.62
16:1	9.43	0.15
18:0	4.21	2.05
18:1	19.69	31.23
18:2n-6	1.83	52.06
18:3n-3	1.69	1.02
20:1	6.28	0.27
20:4n-6	0.10	0.28
22:5n-3	17.49	—
22:6n-3	18.97	0.31

对组织匀浆液用双缩脲法测定蛋白质浓度,试剂盒由北京北化康泰临床化学试剂公司提供。以每mg组织蛋白质中白介素2(IL-2)的ng·mg<sup>-1</sup>作为含量单位。

### 1.4 脾脏淋巴细胞膜脂肪酸组成和比例测定

试验鸡放血后立刻将脾脏取出,在无菌条件下放入4 无钙镁 Hank 's 溶液中,用灭菌不锈钢剪刀去掉脾脏表面的脂肪和膜,再用冰浴的无钙镁 Hank 's 溶液洗涤2~3次。洗后用剪刀剪碎后加入5 mL无钙镁 Hank 's 溶液,用无菌注射器吸取后通过80目不锈钢网,将得到的溶液轻轻地叠加在淋巴细胞分离液(军事医学科学院生产,比重为1.077)上分离脾脏单核细胞,具体操作步骤见[6]。

用氯仿-甲醇(体积分数为2:1)混合溶剂提取脂质,N<sub>2</sub>吹干后用薄层层析分离磷脂,再用一步法甲酯化后进行测定。将磷脂加入正己烷2.5 mL、甲酯化试剂(甲醇与氯乙酰,体积分数为10:1)2 mL、内标(C19)0.5 mL,80 水浴2 h,冷却后加入6% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液2.5 mL,混匀后分为2层,取上层正己烷层用气相色谱进行测定。

## 1.5 鸡脾脏 IFN- mRNA RT-PCR测定

1.5.1 组织中 RNA 的提取 取 50~100 mg 液氮保存的脾脏组织于研钵中加入液氮迅速研磨,然后用 Trizol 试剂(Gibco 公司)按说明书提取总 RNA。

1.5.2 反转录(RT)和 PCR 引物设计 从 EMBL/ DDBJ/ GenBank 读取 CHIFN- 的基因序列。采用 5.0 软件在该基因上、下游设计一引物,引物对内包括 CHIFN- 基因全序列(420 bp):

上游引物: 5'-AACTTGTTGTCTGICCGT-3',

下游引物: 5'-CACCACTTCTGTAAAGATGC-3',

由赛百胜生物公司合成,用 TE Buffer 配成 50 pmol ·  $\mu\text{L}^{-1}$ 。

取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA 和 20 mol d(T)10 引物,在 80 变性 5 min,再加 10 U AMV 及其 buffer,加 dNTP 0.5 mmol ·  $\text{L}^{-1}$ ,在 20  $\mu\text{L}$  反应体系中,于 42 反应 60 min,95 变性 5 min。取 2  $\mu\text{L}$  反转录产物作 PCR 扩增。

1.5.3 PCR 条件的优化 反转录过程,将 RNA 液置于 65 10 min,马上放于冰上,按如下反应进行反转录:模板 RNA 8  $\mu\text{L}$  (约 2  $\mu\text{g}$ ),Bulk First Strand cDNA Reaction Mi 5  $\mu\text{L}$ ,DTT 1  $\mu\text{L}$ ,Pd (N) 6 1  $\mu\text{L}$ ,共 15  $\mu\text{L}$ ;

扩增,反应系为:10  $\times$ Buffer 5  $\mu\text{L}$ ,dNTP 4  $\mu\text{L}$ ,模板 3  $\mu\text{L}$ ,Drp1 1  $\mu\text{L}$ ,Dtp2 1  $\mu\text{L}$ ,DW<sub>2</sub> 35  $\mu\text{L}$ ,总体积 50  $\mu\text{L}$ 。98 预变性 5 min,加入 1  $\mu\text{L}$  Ex Taq DNA 聚合酶,然后加入 50  $\mu\text{L}$  石蜡油,低速离心进入以下循环:94 变性 1 min,53 退火 1 min,72 延伸 1 min,32 个循环,以 72 延伸 10 min 结束。

1.5.4 PCR 产物的检测 取 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物置于 2% 琼脂糖凝胶中,80 和 40 mV 电泳 40 min 后,置于紫外可见分析装置中对扩增产物的凝胶电泳用 Image Master VDS 图像分析软件进行灰度扫描和统计分析。

## 1.6 数据统计与分析

数据用 EXCEL 进行处理后采用 SPSS 10.0 统计软件中 ANOV 法进行方差分析,DUNCAN 氏多重比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 脾脏匀浆液中 IL-2 的水平

IL-2 作为研究较多的细胞因子之一,主要由 T 淋巴细胞中 Th<sub>1</sub> 细胞产生,其能促进 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞的成长。IL-2 活性能够反映淋巴细胞特

别是 T 细胞的功能,介导细胞免疫、迟发型变态反应、炎症反应等,已用于免疫功能的研究<sup>[7]</sup>。脾脏组织匀浆液 IL-2 的浓度测定结果见表 3。由结果看出,脾脏组织匀浆液 IL-2 浓度随着  $n-3/n-6$  PUFA 比值下降而增加。与对照组相比较,添加 PUFA 能够显著增加脾脏 IL-2 的分泌( $P < 0.05$ ),但与低比例  $n-3/n-6$  PUFA 添加组相比,高比例  $n-3/n-6$  PUFA 添加组对脾脏 IL-2 分泌有抑制作用,这与 Friedman 等认为过高或过低  $n-3$  PUFA 能够抑制体内或体外 IL-2 分泌的结论相一致<sup>[8]</sup>。在正常情况下,机体的免疫功能处于平稳状态,细胞因子的分泌受到一定程度的抑制,这对机体是有利的。而当机体遭受外界抗原或病毒刺激时,细胞因子可以迅速生成,提高抗病力。

表 3 日粮中添加不同比例 PUFA 对产蛋鸡脾脏 IL-2 浓度和 IFN- mRNA 水平的影响

Table 3 Effects of dietary PUFA ratios on IL-2 concentration and IFN- mRNA level of spleen tissue

项目	IL-2 水平/ (ng · mg <sup>-1</sup> prot.)	IFN- mRNA/ %
CK	1.736 ± 0.296 a	20.665 ± 2.438 a
1 1	1.992 ± 0.401 ab	24.806 ± 2.000 b
1 32	2.682 ± 0.597 b	28.164 ± 2.028 b

注:同行平均数肩标无相同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

### 2.2 脾脏组织 IFN- mRNA 基因表达

干扰素是一类在同种细胞上具有广谱抗病毒活性的蛋白质,其活性的发挥又受细胞基因组的调节和控制,涉及 RNA 和蛋白质的合成。干扰素具有较广谱的抗病毒活性<sup>[9~11]</sup>。对添加不同比例 PUFA 产蛋鸡脾脏提取的 RNA 进行 RT-PCR,扩增产物的凝胶电泳灰度比较结果见图 1。扫描经统计分析的结果见表 1。

从试验结果可以发现,饲喂高  $n-3/n-6$  PUFA 日粮产蛋鸡脾脏 IFN- 的 mRNA 表达量较低  $n-3/n-6$  PUFA 日粮的低但高于对照组,这与本试验中脾脏组织 IL-2 水平的变化趋势相一致。IL-2 和 IFN- 以及 TNF 主要由 T 细胞中的 Th<sub>1</sub> 细胞分泌,介导细胞免疫、迟发型变态反应等。而 T 细胞中的 Th<sub>2</sub> 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10,介导体液免疫,辅助 B 细胞分化和产生抗体。这两类细胞和细胞因子平衡与自身免疫疾病的发生密切相关。目前对自身免疫疾病的研究主要集中在 Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> 细胞平衡上。王美美等研究了天疱疮患者外周血单核细胞 IL-10 和

IFN- $\gamma$  mRNA 的表达水平,结果发现,急性发病期IFN- $\gamma$  mRNA 表达水平显著高于正常人,IL-10 mRNA 表达量虽然低于正常人,但差异不显著<sup>[12]</sup>。



图1 产蛋鸡添加不同比例 PUFA 对脾脏 mRNA RT-PCR 扩增产物凝胶电泳灰度比较

Fig. 1 RT-PCR products from spleen IFN- $\gamma$  mRNA of laying hens

1 为低  $n-3/n-6$  比值处理, 2 为对照,  
3 为高  $n-3/n-6$  比值处理; ( $n=3$ )

PUFA 能够通过改变细胞因子基因表达调节细胞因子的分泌和产量。研究表明,在给感染李斯特菌的小鼠饲喂富含  $n-3$  PUFA 日粮,脾脏组织 IFN- $\gamma$  mRNA 显著下降<sup>[2~4]</sup>。董伟等研究发现,鱼油来源的 PUFA 能够改变枯否氏细胞的分泌功能,降低患脓毒症大鼠细胞培养液中 TNF、IL-1 和 IL-6 的活性,这可以减缓由于细胞因子过量产生造成的各种副作用如发烧、肝细胞损伤等病理生理学反应<sup>[13]</sup>。

本试验 IFN- $\gamma$  mRNA 表达量在不同处理间有一定的变化趋势,但差异并不显著,说明在正常的生理状况下,由于没有病毒或其他诱生剂的作用,各种细胞因子表达的量较少造成的,但它们是免疫应答的必然结果,对机体是有利,如果细胞因子过量产生也会带来各种副作用。关于细胞因子的分泌和产量是否仅为基因表达发生变化或是基因表达和蛋白质翻译共同发生变化的结果还需要进一步的研究。

### 2.3 脾脏单核细胞膜脂肪酸组成

从表 4 结果来看,与对照和添加低  $n-3/n-6$  PUFA 处理相比,饲喂添加高  $n-3/n-6$  比值日粮产蛋鸡脾脏单核细胞膜磷脂中总  $n-3$  PUFA 的量急剧增加,总  $n-6$  PUFA 显著下降。脾脏单核细胞膜中  $n-3/n-6$  比值能够很好地反映日粮中 2 种脂肪酸的比例,这与 Meluzzi 等的结果<sup>[14]</sup>相一致。对于这种现象的解释是由于  $\Delta-6$  脱饱和酶为  $n-3$  PUFA 和  $n-6$  PUFA 代谢过程中共用酶,日粮中高  $n-3$  PUFA 会降低  $n-6$  PUFA 代谢过程中酶的活性,导致亚油酸向花生四烯酸转化效率降低。此外,在  $n-3$  PUFA 中,DHA 所占的比例在不同处理中要比 EPA 高出近一倍,这说明 EPA 和 DHA 在产蛋鸡体内的转化效率是不一致的,Cossignani 等得出的结论认为产蛋鸡蛋

黄磷脂细胞膜中 DHA 含量要比 EPA 高<sup>[15]</sup>。由于 DHA 相比 EPA 来说对于各种疾病如心血管、抗肿瘤的效果要优于 EPA,因此,细胞膜脂类中脂肪酸的组成和比例是与其功能相适应的。

表 4 日粮中添加不同比例 PUFA 对产蛋鸡脾脏单核细胞膜脂肪酸相对含量的影响

Table 4 Effects of dietary PUFA ratios on fatty acids composition of splenocytes membrane

脂肪酸	产蛋鸡日粮			SEM
	CK	1:1 VE:300	1:32 VE:300	
C14:0	0.21 ab	0.25 b	0.18 a	0.01
C16:0	15.59 c	8.29 b	5.05 a	1.10
C17:0	0.12 a	0.57 bc	0.47 b	0.01
C18:0	7.36 c	6.20 b	3.26 a	0.45
C19:0	38.73 a	65.59 b	80.21 c	4.31
C24:0	0.18 ab	0.28 b	0.11 a	0.01
C14:1	1.19 a	0.38 a	0.25 a	0.02
C16:1	0.28 a	1.37 b	0.75 ab	0.10
C18:1	22.44 d	9.49 b	5.94 a	1.73
C24:1	1.04 b	1.37 b	0.50 a	0.14
C18:2	11.69 d	5.35 bc	3.72 ab	0.88
C18:3	0.54 b	0.09 a	0.18 a	0.06
C22:5	0.16 a	0.32 b	0.17 a	0.03
C22:6	0.32 ab	0.62 c	0.28 ab	0.04
SFA	62.24 a	81.17 b	89.28 c	2.82
MUFA	25.06 c	12.69 b	7.48 a	1.88
PUFA ( $n-6$ )	11.69 d	5.35 bc	3.72 ab	0.88
PUFA ( $n-3$ )	0.10 c	1.03 c	0.57 b	0.09
( $n-6$ )/( $n-3$ )	11.38 a	5.22 a	6.47 ab	0.85

脾脏作为家禽体内重要的免疫器官之一,具有重要的作用,而单核细胞作为脾脏发挥免疫功能的基本单元是由其结构决定的。单核细胞膜中脂质双层膜结构是单核细胞发挥作用的结构基础。随着日粮中  $n-3/n-6$  比值发生变化,单核细胞膜中脂肪酸组成和比例发生变化,进而影响到免疫细胞的功能。VE 作为优良的抗氧化剂能够保证脾脏单核细胞膜脂质双层膜免受自由基的攻击,维持细胞结构与功能的完整性。有研究认为高水平 VE 和  $n-3$  PUFA 在动物肠道内的吸收具有负互作<sup>[16]</sup>,这也许是本试验中时高 VE 添加水平处理组脾脏单核细胞膜磷脂脂肪酸  $n-3/n-6$  比值较低的原因。

### 3 结论

高  $n-3/n-6$  PUFA 处理能够降低产蛋鸡脾脏组

织 IL-2 水平;脾脏单核细胞膜脂肪酸组成和比例显著受到日粮 PUFA 组成的影响;脾脏组织 IFN- $\gamma$  表达量在饲喂不同 PUFA 比例日粮产蛋鸡中也不同。不同 PUFA 可通过改变细胞因子基因表达和免疫细胞膜 PUFA 组成的改变影响机体的免疫功能。

### 参 考 文 献

- [1] 上野川修一著. 身体与免疫机制 [M]. 刘铁聪, 苏钟浦译. 北京: 科学出版社, 2003
- [2] Fristche KL, Anderson M, Feng C. Composition of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid impair murine interleukin-12 and interferon- $\gamma$  in vitro [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2000, 182: S54 ~ S61
- [3] Fristche KL, Byrge M, Feng C. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil reduce interleukin-12 and interferon-gamma production in mice [J]. *Immunology Letters*, 1999, 167 ~ 173
- [4] McMurray DN, Jolly CA, Chapkin RS. Effects of dietary  $n-3$  fatty acids on T cell activation and T cell receptor-mediated signaling in a murine model [J]. *J Infectious Diseases* 2000, 182: S103 ~ 107
- [5] 黄国伟, 孙晓光, 吴元芳, 等. 白细胞介素-2 的放射免疫分析研究 [J]. *标记免疫分析与临床*, 1996, 2: 2
- [6] 乔彦良. 西咪替丁对免疫功能的影响与应用研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2000
- [7] Matsushita K, Fujiwara H, Matsumoto T, et al. Interleukin 2 mediated growth of leukemia cell in lymph nodes of patients with acute-T cell leukemia/lymphoma [J]. *Leuk Res*, 1996, 20 (2) 135 ~ 139
- [8] Friedman A, Sklan D. Effect of dietary fatty acids on antibody production and fatty acid composition of lymphoid in broiler chicks [J]. *Poultry Sci*, 1995, 74: 1463 ~ 1469
- [9] 吴志光. 北京鸭干扰素基因的分子克隆及序列分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2001
- [10] 高山. 鸡干扰素- $\gamma$  基因的克隆与表达 [D]. 北京: 中国农业大学, 2001
- [11] 王平利, 李玉谷, 辛朝安. 非特异性免疫研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2002, 11: 50 ~ 52
- [12] 王美美, 许桦. 系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞分泌 IL-10 和 IFN- $\gamma$  水平的研究 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2002, 1: 28 ~ 30
- [13] 董伟, 李新建, 陈泮藻, 等. 不饱和脂肪酸对枯否氏细胞分泌功能的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 1995, 5: 261 ~ 262
- [14] Meluzzi A, Sirri F, Manfreda G, et al. Effects of dietary vitamin E on the quality of table eggs enriched with  $n-3$  long-chain fatty acids [J]. *Poultry Sci*, 2000, 79: 539 ~ 545
- [15] Cossignani L, Santinelli M, Simonetti S, et al. Incorporation of  $n-3$  PUFA into hen egg yolk lipids. II: Structural analysis of triacylglycerols, phosphatidylcholines, and phosphatidylethanolamines [J]. *J Food Sci*, VI(3): 293 ~ 305
- [16] Lynch P B. Vitamin E in livestock feeding. Symposium on vitamin E and meat quality [C]. Cork, Ireland. University of College, 1994