

胡麻脂肪酸脱氢酶基因*fad3b*过表达小鼠模型的建立及其功能分析

魏著英 菅璐 杨磊 高阳 王东 陈晨 左永春 李光鹏*

(内蒙古大学实验动物研究中心, 呼和浩特 010070)

摘要 脂肪酸脱氢酶3(fatty acid desaturase 3, *fad3*)是高等植物细胞中一种催化n-6多不饱和脂肪酸转化为n-3多不饱和脂肪酸的酶。该研究将胡麻*fad3b*基因转染小鼠C2C12细胞, 转基因细胞中的n-6多不饱和脂肪酸含量显著降低, n-3多不饱和脂肪酸含量显著升高。*Fad3b*转基因小鼠中, *fad3b*基因在不同组织器官的mRNA水平与蛋白质水平的表达趋势并不一致。在*fad3b* mRNA水平上, 肝脏中最高, 骨骼肌、脂肪、脑和心脏中较低; 在脂肪酸水平上, 骨骼肌、脑和肝脏等组织的n-6/n-3显著降低, 而脂肪、卵巢和睾丸组织中的变化不显著。该研究结果提示, 胡麻来源的*fad3b*基因能够在转基因小鼠中正常发挥功能, 促使n-6向n-3多不饱和脂肪酸转化, *fad3b*转基因小鼠模型可能比*fat1*小鼠在基因功能专一性以及动物生殖健康等方面更有优势。

关键词 *fad3*; 转基因小鼠; 多不饱和脂肪酸; 器官; 组织

The Role of Fatty Acid Desaturase in Flax *fad3b* in Transgenic Mice Model

Wei Zhuying, Jian Lu, Yang Lei, Gao Yang, Wang Dong, Chen Chen, Zuo Yongchun, Li Guangpeng*

(Research Center for Laboratory Animal Science, Inner Mongolia University, Huhott 010070, China)

Abstract The fatty acid desaturase 3 (*fad3*) played a pivotal role in convert n-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFAs) to n-3 PUFAs in plants. In this study, *fad3b*, a family member of *fad3* from *Linum usitatissimum* Linn was tranfected into C2C12 myoblasts. The n-6 PUFAs were significant decrease, and the n-3 PUFAs were significant increase in the transfected cells. *Fad3b* transgenic mice were produced by pronuclear microinjection, and the relative expression of *fad3b* in tissue were analyzied. The results showed that in compared to non-transgenic mice, highest mRNAs level of *fad3b* was detected in liver, and its lower levels in skeletal muscle, fat, brain and heart. In addition, there is a significant reduction of n-6/n-3 PUFAs ratios in skeletal muscle, brain and liver, but no difference in fat, ovary and testis between transgenic and non-transgenic mice. Altogether, fatty acid desaturase *fad3b* from *Linum usitatissimum* Linn could be expressed in mouse myoblasts and transgenic offspring, and play the role to convert n-6 PUFAs to n-3 PUFAs in mammalian tissues. These results confirmed that in compared to *fat1*, the function of *fad3b* was more concentrated, and *fad3b* transgenic mouse could be more appropriate model for fertility studies.

Keywords *fad3*; transgenic mice; poly unsaturation fatty acid; organ; tissue

脂肪酸脱氢酶3(fatty acid desaturase 3, *fad3*)是一类可以催化脂肪酸酰基特定位置脱氢形成不饱和

脂肪酸的酶^[1]。植物中的脂肪酸脱氢酶种类丰富, 如 *fat2*、*fad2*和*fad6*是 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶(n-6脂肪酸脱

收稿日期: 2016-07-08 接受日期: 2016-12-23

转基因生物新品种培育科技重大专项(批准号: 2014ZX08007-002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-5298583, E-mail: imudwzx@163.com

Received: July 8, 2016 Accepted: December 23, 2016

This work was supported by the National Transgenic Animal Program (Grant No.2014ZX08007-002)

*Corresponding author. Tel: +86-471-5298583, E-mail: imudwzx@163.com

网络出版时间: 2017-02-10 15:53:57

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170210.1553.004.html>

氢酶)的成员,催化油酸(oleic acid, OA)生成亚油酸(linoleic acid, LA)^[1-2]; *fat1*、*fad3*、*fad7*和*fad8*是 $\Delta 15$ 脂肪酸脱氢酶($n-3$ 脂肪酸脱氢酶)的成员,催化亚油酸生成 α 亚麻酸(α -linolenic acid, ALA)^[1-2]; $\Delta 17$ 脂肪酸去饱和酶则特异性催化花生四烯酸(arachidonic acid, AA)转化为二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)^[3]。在内质网中,存在 $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 和 $\Delta 6$ 等一系列脂肪酸脱氢酶和脂肪链延长酶^[4], $\Delta 6$ 脂肪酸脱氢酶催化LA和ALA生成二高- γ -亚麻酸(dihomo- γ -linolenic acid, DGLA)和二十碳四烯酸(eicosatetraenoic acid, ETA), $\Delta 5$ 脂肪酸脱氢酶继续将DGLA和ETA转化成AA和EPA, $\Delta 4$ 脂肪酸脱氢酶催化EPA生成二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)。在 $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 和 $\Delta 6$ 的作用下,形成长链的多不饱和脂肪酸^[4]。在 $n-6$ 向 $n-3$ 多不饱和脂肪酸转化过程中, $\Delta 15$ 与 $\Delta 17$ 脂肪酸脱氢酶起主要作用。

$n-3$ 多不饱和脂肪酸主要包括ALA、EPA和DHA, $n-6$ 多不饱和脂肪酸主要包括LA、AA和 γ 亚麻酸(γ -linolenic acid, GLA)。由于哺乳动物体内不含有 $\Delta 12$ 、 $\Delta 15$ 和 $\Delta 17$ 等脂肪酸脱氢酶,自身不能将 $n-6$ 转化为 $n-3$,机体所需的 $n-3$ 脂肪酸主要通过摄食获得。有两个途径可以实现动物体内 $n-6$ 向 $n-3$ 的转化,一是将脂肪酸脱氢酶基因转入动物基因组内,使动物自身完成 $n-6$ 向 $n-3$ 的转化;二是增加 $\Delta 6$ 脂肪酸脱氢酶的底物ALA的含量,通过 $\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 和 $\Delta 6$ 脱氢酶和延长酶促使EPA和DHA等 $n-3$ 多不饱和脂肪酸的合成。在上述两种途径中,转基因途径更加直接和彻底。在已报道的多不饱和脂肪酸脱氢酶基因的转基因操作中,主要有来自秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的*fat1*基因和来自植物的*fad2*或*fad3*基因。Kang等^[5]将*C. elegans*的*fat1*基因转入小鼠心肌细胞,几乎诱使细胞中的 $n-6$ 多不饱和脂肪酸均被转化为 $n-3$ 多不饱和脂肪酸, $n-6/n-3$ 从15降到1^[6]。在*fat1*转基因小鼠中,ALA、EPA、二十二碳五烯酸(docosapentaenoic, DPA)和DHA等 $n-3$ 多不饱和脂肪酸均显著提高, $n-6/n-3$ 从20~50下降到1^[7],显示出*fat1*基因的高效催化作用。朱贵明等^[8]的研究也表明,*fat1*转基因小鼠的各种组织均表达*fat1*基因,其中肌肉组织中的DHA含量占总脂肪酸的12.15%, $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸含量占总脂肪酸的比例达到23.00%。赖良学等^[9]和潘登科等^[10]均报道,*fat1*转基因猪组织中的 $n-3$ 多不饱和脂肪酸含量显著高于普通猪。李光鹏等^[11]获得的*fat1*转基因

奶牛的组织中 $n-6/n-3$ 降低了5~15倍,转基因牛健康状况良好,具有正常的繁殖能力,顺利产生后代,其奶汁中富含 $n-3$ 多不饱和脂肪酸。

在利用植物来源的多不饱和和脱氢酶基因转基因方面, Kazuhiro等^[12]利用菠菜的 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶2(*fad2*)基因制备转基因猪,在*fad2*转基因猪体内,LA可以从头合成,白色脂肪组织中LA含量提高了20.00%。2013年,李子义等^[13]将线虫的*fat1*基因和菠菜的*fad2*基因制成了*fat1-fad2*转基因小鼠,不仅提高了小鼠体内 $n-6$ 和 $n-3$ 多不饱和脂肪酸水平,而且证实该转基因小鼠可以自身合成多不饱和脂肪酸。2009年,Indo等^[14]克隆了红亚麻*fad3*基因,对其进行密码子优化后转入牛肌肉卫星细胞,又将人源*fad3(hfad3)*肌肉卫星细胞分化为脂肪细胞,气相色谱分析显示,ALA含量是非转基因细胞的10倍,DPA和DHA含量较对照组显著升高, $n-3$ 多不饱和脂肪酸总量比对照组增加3.4%, $n-6/n-3$ 从2.63下降到2.10和1.57。

Fat1脂肪酸脱氢酶在转基因动物中的研究应用较为广泛,但是同属于 $\Delta 15$ 脂肪酸脱氢酶的*fad3*、*fad7*和*fad8*等的相关研究和应用未见系统的报道,*fad7*和*fad8*是定位于植物叶绿体中的脂肪酸脱氢酶,不适合在动物中应用,*fad3*与*fat1*同属于内质网跨膜蛋白,Indo等^[14]仅在细胞水平对*fad3*做了简单的尝试,没有在动物个体水平研究该基因的功能。

本研究利用胡麻(*Linum usitatissimum*)的*fad3b* mRNA序列,对cDNA序列进行了密码子优化。将密码子优化后的*fad3b*基因转入小鼠细胞中,*fad3b*可以有效地将 $n-6$ 多不饱和脂肪酸转化为 $n-3$ 多不饱和脂肪酸。通过制备*fad3b*转基因小鼠模型,发现*fad3b*在小鼠体内可以将 $n-6$ 转化为 $n-3$ 多不饱和脂肪酸,显著提高了转基因小鼠体内 $n-3$ 多不饱和脂肪酸的水平,并且 $n-3$ 和 $n-6$ 多不饱和脂肪酸的变化情况也表现出一定的组织差异。*Fad3b*小鼠为开展多不饱和脂肪酸生理功能和调控机制等相关研究提供了良好的实验动物模型。同时,为了更好地研究多不饱和脂肪酸在心脑血管疾病、癌症以及糖尿病等疾病中的治疗作用和相关作用机制,仅仅通过体外的细胞实验或饲喂的方式建立小鼠模型是不能够满足实验需求的。因此,建立一个无饮食等混杂因素的干扰的动物模型是非常必要的,而*fad3b*转基因小鼠模型为科研人员提供了一种无干扰因素

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料 实验中所使用的小鼠均购自内蒙古大学实验动物研究中心, 实验动物使用许可证号: SYXK(蒙)2014-0002。所有动物实验均通过内蒙古大学伦理委员会批准。小鼠饲养在SPF级动物房, 室温22~24 °C, 相对湿度50%~60%, 动物房光照时间为8:00~20:00。按国家标准啮齿类动物干燥饲料喂养, 自由饮食饮水。用于原核注射的受精卵来源于8周龄的BDF1小鼠, 用于胚胎移植受体的是8周龄的昆明小白鼠。C2C12细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

1.1.2 试剂及仪器 各种限制性核酸内切酶、DNA连接酶、RNA提取试剂、cDNA反转录试剂盒、PCR及Real-time PCR相关试剂均购自TaKaRa公司。细胞转染试剂LTX购自Invitrogen公司, 氯仿、甲醇、异丙醇、无水乙醇、氢氧化钾等分析纯化学试剂购自天津永大化学试剂有限公司。正己烷(色谱纯试剂)购自天津永大化学试剂有限公司。

体视显微镜和原核注射的显微操作系统购自尼康公司。常规PCR仪和Real-time PCR仪购自ABI公司。气相色谱-质谱联用仪(GCMS-QP2010ultra)购自岛津国际贸易(上海)有限公司。

1.2 引物及基因序列合成

引物和*fad3b*基因的合成以及PCR产物测序由TaKaRa公司完成。引物见1.3, *fad3b*基因序列见发明专利(ZL201310344833.5)。

1.3 载体构建

合成的*fad3b*基因连接在PMD19T-simple载体中, 通过EcoR I和BamH I酶切, 回收目的基因片段。以实验室已有的AcGFP载体为骨架, 将*fad3b*基因连接到表达载体中并转化获载体质粒。对构建成功的载体进行*fad3b*基因的PCR产物测序。测序引物的序列为, F: 5'-CCG GAA TTC TTC AAA ACT GTG GCT CTG CAG GAC C-3'; R: 5'-GCG GGA TCC CTC AGA AAG AAA GCT GGG GGC G-3'。根据测序结果挑选与原序列完全一致的质粒, 用于下一步实验。

1.4 细胞转染

转染方法参见Invitrogen公司LTX转染试剂盒操作说明书, 具体步骤如下。800 ng质粒DNA用100 μL Opti-MEM稀释, 加入2 μL Plus液体, 混匀后室温静

置5 min; 再将3 μL LTX用100 μL Opti-MEM稀释, 加入DNA液体中, 混匀, 室温静置30 min。30 min后将DNA-LTX复合物添加到培养在24孔板中的C2C12细胞中(1个孔), 37 °C、5% CO₂培养箱中孵育6 h后更换正常细胞培养液。孵育24 h检查转染情况, 孵育48 h将转染的细胞传代, 并添加1 000 ng/mL G418, 筛选转染阳性细胞。分别提取转基因细胞的DNA和RNA, PCR鉴定*fad3*的转染情况和表达情况。

1.5 细胞中脂肪酸含量检测

收集转基因阳性的细胞和非转基因细胞于离心管中, PBS洗2次, 再次收集细胞后加入2.5%硫酸/甲醇溶液1 mL。80 °C水浴90 min, 待室温冷却后, 加入1.5 mL 0.9%氯化钠溶液和1 mL正己烷, Vortex振荡5 min, 2 000 r/min离心5 min, 将脂肪酸提取到有机相, 并将上清转移到新的EP管中, 加入饱和氢氧化钾-甲醇溶液, Vortex振荡5 min, 2 000 r/min离心10 min, 收集上层液体于GC-MAS上样瓶中, 上机进行脂肪酸含量分析。

气相色谱条件: 色谱柱为HP-88, 载气为氦气, 恒线速度20.0 cm/s, 分离比20.0%, 进样体积1 μL, 升温程序为60 °C 1 min、40 °C/min 140 °C 10 min、4 °C/min 240 °C 15 min。

1.6 转基因小鼠制备

取合笼0.5 d见栓的雌鼠, 输卵管中收集原核期的受精胚胎, 借助显微操作系统将浓度为3 ng/μL的质粒DNA注射到雄原核中, 注射成功的受精胚胎移植到见栓1.5 d的受体母鼠输卵管中, 19 d后获得仔鼠。待小鼠断乳后, 提取鼠尾DNA, PCR鉴定转基因阳性小鼠。PCR引物同1.3。

1.7 实时定量PCR

收集转基因小鼠及其同窝非转基因小鼠的心、肝、脾、肺、肾、胰腺、脑、肌肉、脂肪、睾丸(雄性)、卵巢(雌性)等组织。检测*fad3b*基因在不同组织中的表达情况。选取管家基因3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *gapdh*)为实时定量的内参基因, TaKaRa公司合成*gapdh*和*fad3b*基因引物。以反转录得到的cDNA为模板进行*fad3b*和*gapdh*基因的实时定量PCR扩增。*gapdh*引物顺序如下所示, F: 5'-CGG CTG GAG AGC AAA AGA CCG AAA G-3'; R: 5'-GAG CCA CGT CCC TGT CGT CGT CTT C-3'。*Fad3b*引物顺序如下所示, F: 5'-ATG TTC TGG GCC GTC TTT GT-3'; R: 5'-TTC

TGG TGG TGG GTC TTG TG-3'。

1.8 组织的脂肪酸检测

取转基因小鼠和同窝非转基因小鼠的心、肝、脾、肺、肾、胰腺、脑、骨骼肌、脂肪、睾丸(雄性)和卵巢(雌性), 匀浆器将各组织匀浆, 匀浆过程中加入氯仿-甲醇(2:1)溶剂2~4 mL, 室温匀浆5~10 min, 匀浆液转入15 mL离心管中室温静置, 待液体分层后, 上层清液转移至新管, 下层组织浑浊液再加入2 mL氯仿-甲醇(2:1)溶剂, 充分混匀后, 静置过夜。合并两次萃取的所有上清液, 氮吹仪60 °C水浴吹干溶剂, 得沉淀。沉淀加2 mL色谱纯正己烷溶解, 再加400 μ L饱和氢氧化钾-甲醇溶液进行甲酯化, 剧烈振荡2 min, 静置10 min。吸取700 μ L上清加入上样小瓶, 气相色谱检测脂肪酸含量。气相色谱条件同1.5。

1.9 转基因小鼠外源基因拷贝数分析

根据万艳等^[15]绝对定量PCR鉴定外源基因拷贝数的方法, 分析转基因小鼠基因组中*fad3b*序列的拷贝数。提取转基因阳性小鼠的鼠尾DNA和*fad3b*质粒DNA, 并精确测定DNA浓度。按照万艳等^[15]构建标准品的方法, 将 5.3×10^7 拷贝的质粒DNA与100 ng非转基因小鼠DNA混合, 10倍梯度稀释, 获得含有 5.3×10^7 、 5.3×10^6 、 5.3×10^5 、 5.3×10^4 、 5.3×10^3 拷贝外源基因的标准品DNA。

实时定量PCR反应体系: 1 μ L模板、2 μ L 10 μ mol/L的上、下游引物, 10 μ L SYBR Green Mix, H₂O补足20 μ L。反应条件: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C复性延伸31 s, 40个循环。每组实验重复3次以上。

绘制标准曲线: 以梯度稀释的质粒标准品为模板, 通过实时定量PCR获得相应的*Ct*值, 以*Ct*值为横坐标, \log_5 (拷贝数)为纵坐标, 绘制标准曲线, 并获得*Ct*值与拷贝数之间的定量方程。

转基因小鼠拷贝数确定: 以100 ng待测小鼠DNA为模板, 通过实时定量PCR获得*Ct*值, 带入标准曲线方程中, 计算相应的拷贝数。1个小鼠细胞中大约含有 3×10^9 bp, 约为 3.415×10^{-3} ng, 即293个细胞的DNA约为1 ng。100 ng DNA大约包含 2.93×10^4 个细胞的基因组。通过公式计算的拷贝数除以100 ng DNA的细胞数量, 所得结果即为转基因小鼠基因组中含有的*fad3b*拷贝数。

1.10 数据分析

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。各组织中*fad3b* mRNA水平及各组织的脂肪酸含量, 均以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示, 转基因小鼠与非转基因小鼠样本均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *Fad3b*在细胞水平的功能检测

利用测序正确的*fad3b*质粒(图1), 通过脂质体法转染小鼠C2C12细胞48 h后, 可以观察到, 转染的细胞中表达绿色荧光蛋白(图2A和图2B)。G418富集*fad3b*细胞15d后, 提取细胞的DNA和RNA, PCR检测到细胞基因组中存在外源基因*fad3b*(图2C); mRNA水平中也检测到*fad3b*的表达(图2D), 通过流式细胞仪分析转染48 h时转基因细胞的阳性率为361.60%(图2E)。

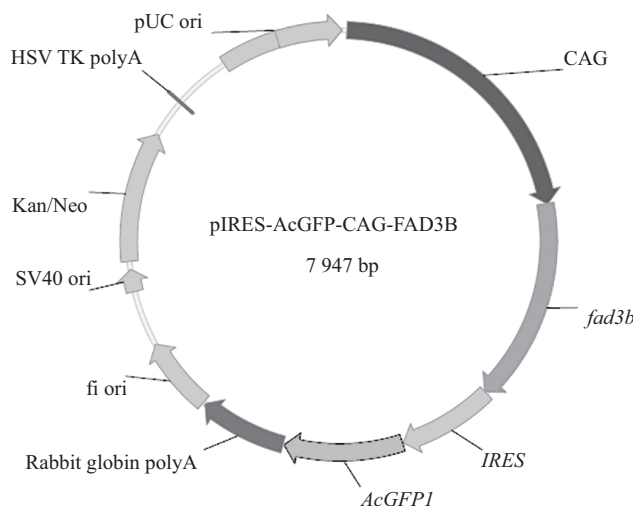
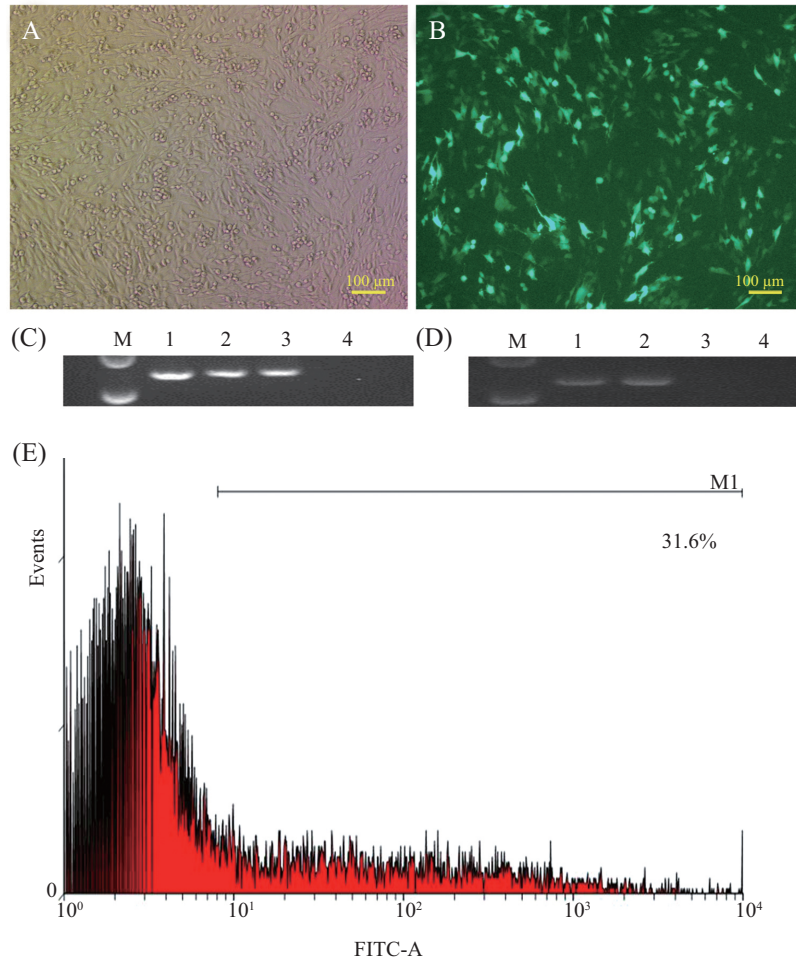


图1 *Fad3b*载体示意图

Fig.1 Diagram of *fad3b* expression vector



A: *fad3b*转基因C2C12细胞; B: *fad3b*转基因细胞表达绿色荧光蛋白; C: 转基因细胞中*fad3b* DNA的PCR鉴定; D: *fad3b*转基因细胞RNA的PCR鉴定; M: marker DL2000; 1: 质粒PCR; 2、3: 转基因细胞RNA PCR产物; 4: 水。E: 转基因细胞阳性率检测。

A: *fad3b* transgenic C2C12 cells; B: GFP expressed in *fad3b* transgenic cells; C: identified *fad3b* DNA in transgenic cells; D: identified *fad3b* RNA in transgenic cells; M: marker DL 2000; 1: plasmid PCR; 2,3: *fad3b* cells RNA product; 4: H₂O. E: positive rate of transgenic cells.

图2 *Fad3b*过表达细胞鉴定

Fig.2 Identified *fad3b* transgenic cells

提取转基因细胞和非转基因细胞的总脂肪酸, 分析发现, *fad3b*细胞的n-6多不饱和脂肪酸显著低于对照组细胞(6.54% vs 7.33%), 其中AA在总脂肪酸中的含量从5.54%下降到3.57%。n-3多不饱和脂肪酸含量显著高于对照组细胞(4.67% vs 3.06%), 其中EPA和DHA含量增加较为显著, 实验组和对照组结果分别为2.13% vs 1.50%和1.72% vs 1.20%。对照组细胞多不饱和脂肪酸n-6/n-3为2.40, 而*fad3b*转基因细胞中这一比值只有1.43。来源于胡麻的*fad3b*基因显著改变了体外培养的小鼠细胞的多不饱和脂肪酸含量, 增加了n-3多不饱和脂肪酸的含量, 同时降低了n-6多不饱和脂肪酸在总脂肪酸中的比例(表1)。

2.2 *Fad3b*转基因小鼠制备

将*fad3b*质粒经显微注射后, 得到330枚原核注

射胚。将这些胚胎分别移植到11只受体小鼠子宫中; 19 d后, 出生67只小鼠; 经过PCR鉴定, 23只为转基因阳性(图3), 阳性率为34.30%, 其中雌鼠9只, 雄鼠14只。

2.3 转基因小鼠*fad3b*拷贝数分析

实时定量PCR结果如表2所示, 以标准品中*fad3b*拷贝数的对数为纵坐标, 以Ct值为横坐标, 制作的定量标准曲线, 获得定量方程 $Y = -0.229 5X + 11.619$, *fad3b*的扩增效率为90.50%。

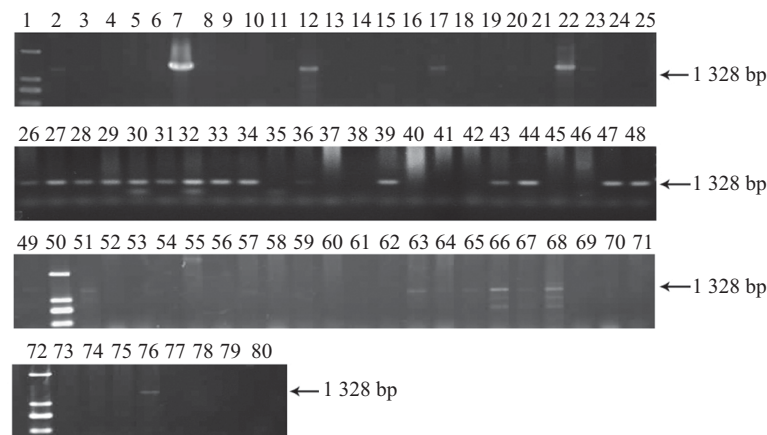
通过计算得出, 非转基因小鼠wt-1和wt-2的*fad3b*拷贝数均为 0.05 ± 0.00 , 即基因组中没有*fad3b*序列, 转基因小鼠基因组中的拷贝数分别为 4.01 ± 0.14 、 3.40 ± 0.11 和 2.92 ± 0.00 、 3.11 ± 0.00 、 2.87 ± 0.00 、 4.22 ± 0.00 , 如表3所示。

表1 *Fad3b*过表达细胞的脂肪酸含量分析
Table 1 Analysis of fatty acid content in *fad3b*-expressed cells

| 脂肪酸 Fatty acid | 实验组 <i>fad3b</i> | 对照组 Control |
|-----------------------|---------------------|----------------|
| Linoleic acid | 2.01%±0.10%* | 1.78%±0.05% |
| γ-Linolenic acid | 0.96%±0.10% | 0 |
| Arachidonic acid | 3.57%±0.37%* | 5.54%±0.15% |
| α-Linolenic acid | 0.81%±0.08%* | 0.36%±0.31% |
| Eicosapentaenoic acid | 2.13%±0.35%* | 1.50%±0.15% |
| Docosahexaenoic acid | 1.72%±0.21%* | 1.20%±0.06% |
| n-6 total | 6.54%±0.46%* | 7.33%±0.21% |
| n-3 total | 4.67%±0.63%* | 3.06%±0.11% |
| n-6/n-3 | 1.43±0.18* | 2.40±0.11 |

* $P < 0.05$, 与对照组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group.



1、50、72: DL2000 marker; 2~6、77~80: 阴性对照; 7: 阳性对照; 8~49、51~71、73~76: 小鼠DNA的PCR产物。
1,50,72: DL2000 marker; 2-6,77-80: negative control; 7: positive control; 8-49,51-71,73-76: DNA PCR products.

图3 F0代*fad3b*转基因小鼠鉴定

Fig.3 Identification of F0 generation of *fad3b* transgenic mice

表2 *Fad3b*质粒拷贝数与*Ct*值
Table 2 The copy numbers of *fad3b* plasmid and *Ct* value

| 拷贝数 Copy numbers | log5(拷贝数) log5 (copy numbers) | <i>Ct</i> 值 <i>Ct</i> value |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 5 300 000 | 9.62 | 8.91 |
| 530 000 | 8.19 | 14.93 |
| 53 000 | 6.76 | 20.65 |
| 5 300 | 5.33 | 27.73 |

2.4 *Fad3b*基因在转基因小鼠体内的表达分析

分别取3只雌鼠和3只雄鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、骨骼肌、脂肪和脑组织,提取总RNA后,检测*fad3b*基因在不同组织中的表达情况。结果如图4所示,*fad3b*基因在肝脏中的表达量最高,在骨骼肌、脂肪、脑和心脏中的表达量较低,不同组织间的表达差异较明显。

2.5 *Fad3b*转基因小鼠不同组织中脂肪酸含量变化分析

通过气相质谱分析*fad3b*转基因小鼠和非转基因小鼠各组织的脂肪酸成分组成,结果显示,肝脏、脑、肾脏、肺脏和卵巢以及睾丸中n-6多不饱和脂肪酸比例显著下降;骨骼肌中略有下降,但是差异不显著;脂肪组织中n-6多不饱和脂肪酸的比例显著上

表3 转基因小鼠*fad3b*拷贝数分析
Table 3 The copy numbers of *fad3b* in transgenic mice

| 小鼠编号 | Ct值 | 总拷贝数 | DNA量(ng) | 拷贝数 |
|-------------|------------|---------------------|-----------------|--------------|
| Mice number | Ct value | Total copy numbers | DNA amount (ng) | Copy numbers |
| Fad3-1 | 19.02±0.08 | 117 648.90±3 986.68 | 100 | 4.01±0.14 |
| Fad3-2 | 19.47±0.09 | 99 554.67±3 258.29 | 100 | 3.40±0.11 |
| Fad3-3 | 19.88±0.00 | 85 582.18±0.00 | 100 | 2.92±0.00 |
| Fad3-4 | 19.71±0.00 | 91 262.02±0.00 | 100 | 3.11±0.00 |
| Fad3-5 | 19.92±0.00 | 84 187.21±0.00 | 100 | 2.87±0.00 |
| Fad3-6 | 18.88±0.00 | 123 575.20±0.00 | 100 | 4.22±0.00 |
| Wt-1 | 30.87±0.06 | 1 476.52±36.54 | 100 | 0.05±0.00 |
| Wt-2 | 30.83±0.00 | 1 496.31±0.00 | 100 | 0.05±0.00 |

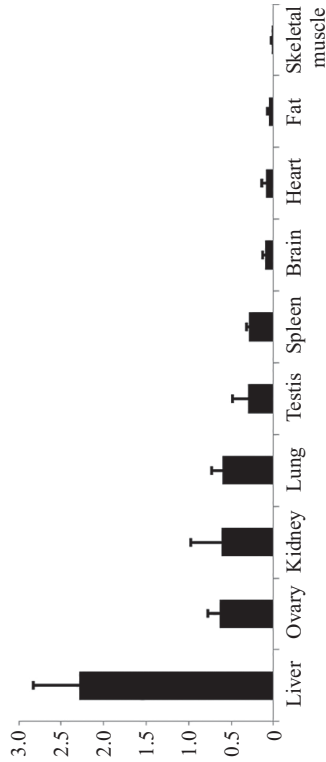


图4 实时定量PCR检测转基因小鼠各组织中*fad3b* mRNA水平
Fig.4 Determination of mRNA levels of *fad3b* in different tissues of transgenic mice by Real-time PCR

表4 *Fad3b*转基因小鼠各组织脂肪酸含量分析
Table 4 Analysis of fatty acid content in different tissues of *fad3b* mice

| 组织 | | 亚油酸 (C18: 2n-6) | | γ-亚麻酸 (C18: 3n-6) | | 花生四烯酸 (C20: 4n-6) | | α-亚麻酸 (C18: 3n-3) | | 二十碳五烯酸 (C20: 5n-3) | | 二十二碳六烯酸 (C22: 6n-3) | | n-6/n-3 |
|-----------------|---------|-----------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|--------------------|-------------|---------------------|-------------|---------|
| | | (C18: 2n-6) | (C18: 2n-6) | (C18: 3n-6) | (C18: 3n-6) | (C20: 4n-6) | (C20: 4n-6) | (C18: 3n-3) | (C18: 3n-3) | (C20: 5n-3) | (C20: 5n-3) | (C22: 6n-3) | (C22: 6n-3) | |
| Skeletal muscle | Fad3 | 24.05±3.35 | 0.09±0.04 | 2.18±0.81* | 2.83±0.50 | 0.51±0.16 | 9.48±5.13* | 26.32±2.69 | 12.81±4.85* | 2.37±0.84* | | | | |
| | Control | 24.98±3.45 | 0.10±0.02 | 1.37±0.56 | 3.25±0.50 | 0.41±0.22 | 3.57±2.52 | 26.44±3.54 | 7.23±2.36 | 4.15±1.65 | | | | |
| Heart | Fad3 | 17.32±2.48 | 0.05±0.01 | 4.23±0.33 | 0.67±0.23* | 0.60±0.08* | 28.97±4.11 | 21.59±2.2 | 30.24±4.04 | 0.72±0.09* | | | | |
| | Control | 19.31±2.68 | 0.06±0.01 | 3.61±1.52 | 1.07±0.62 | 0.52±0.06 | 25.90±8.24 | 22.96±1.34 | 27.49±7.61 | 0.92±0.31 | | | | |
| Fat | Fad3 | 34.10±5.19* | 0.09±0.03* | 0.23±0.13* | 7.09±1.26* | 0.23±0.09* | 0.37±0.19* | 34.42±5.29* | 7.69±1.49 | 4.59±0.85 | | | | |
| | Control | 28.14±1.23 | 0.05±0.01 | 1.34±1.03 | 4.14±0.68 | 0.13±0.06 | 2.55±2.12 | 29.53±2.25 | 6.81±1.51 | 4.49±0.71 | | | | |
| Brain | Fad3 | 1.03±0.26 | 0.02±0.01 | 8.13±0.59* | 0.06±0.03* | 0.19±0.04* | 15.28±1.14* | 9.17±0.82* | 15.53±1.18* | 0.59±0.05* | | | | |
| | Control | 1.06±0.07 | 0.03±0.00 | 10.26±0.27 | 0.04±0.01 | 0.14±0.04 | 16.82±0.89 | 11.35±0.31 | 17.00±0.91 | 0.67±0.03 | | | | |
| Liver | Fad3 | 17.68±0.40* | 0.17±0.03* | 9.65±1.23* | 0.88±0.14 | 3.33±0.83 | 15.33±1.74 | 27.5±0.99* | 19.55±1.85 | 1.42±0.12* | | | | |
| | Control | 21.28±3.14 | 0.23±0.10 | 11.44±1.34 | 0.98±0.14 | 2.87±1.29 | 15.91±2.23 | 32.95±4.06 | 19.76±3.09 | 1.75±0.52 | | | | |
| Spleen | Fad3 | 11.52±3.80* | 0.15±0.02 | 8.10±1.22 | 1.02±0.52* | 1.30±0.09 | 4.93±0.44 | 19.73±2.75 | 7.24±0.35* | 2.72±0.31* | | | | |
| | Control | 20.52±3.99 | 0.13±0.04 | 8.00±2.50 | 1.64±0.38 | 1.31±0.13 | 5.24±1.08 | 28.63±1.53 | 8.20±0.83 | 3.54±0.52 | | | | |
| Lung | Fad3 | 11.66±2.06* | 0.13±0.01* | 5.83±0.62* | 0.93±0.27* | 1.04±0.23 | 5.81±0.53 | 17.61±1.72* | 7.77±0.71 | 2.27±0.19* | | | | |
| | Control | 17.86±0.97 | 0.17±0.04 | 5.14±0.84 | 1.65±0.30 | 0.89±0.10 | 5.56±0.55 | 23.17±0.48 | 8.10±0.26 | 2.86±0.05 | | | | |
| Kidney | Fad3 | 21.48±4.41* | 0.06±0.00* | 6.66±2.54 | 2.19±0.78 | 1.54±0.35 | 9.10±2.79 | 28.2±2.10* | 12.83±2.50 | 2.29±0.51* | | | | |
| | Control | 25.54±1.72 | 0.07±0.01 | 6.70±2.53 | 2.54±0.45 | 1.43±0.26 | 7.75±0.92 | 32.31±2.37 | 11.71±0.55 | 2.76±0.09 | | | | |
| Ovary | Fad3 | 22.61±5.18* | 0.07±0.01* | 0.52±0.07* | 3.51±1.08* | 0.29±0.03 | 0.68±0.02 | 23.2±5.12* | 4.48±1.09* | 5.2±0.11 | | | | |
| | Control | 34.49±6.72 | 0.11±0.02 | 0.91±0.11 | 5.70±0.80 | 0.24±0.07 | 0.74±0.13 | 35.51±6.82 | 6.69±0.99 | 5.29±0.41 | | | | |
| Testis | Fad3 | 18.68±12.45* | 0.16±0.01* | 5.89±2.77* | 2.48±1.70* | 0.42±0.17 | 2.95±1.00* | 24.69±9.77* | 5.85±0.70* | 4.1±1.25 | | | | |
| | Control | 33.73±0.05 | 0.12±0.00 | 2.01±0.04 | 5.03±0.01 | 0.33±0.00 | 1.55±0.04 | 35.86±0.05 | 6.91±0.05 | 5.19±0.04 | | | | |

**P*<0.05, 与对照组作比较。

**P*<0.05 compared with control group.

升。骨骼肌中n-3多不饱和脂肪酸的比例显著上升;脂肪、心脏和肾脏中的比例略有上升,但是差异不显著;脑、脾脏、卵巢和睾丸中显著下降。从n-6/n-3的比值来看,骨骼肌、脑和肝脏等组织脂肪酸的这一比例都有显著降低,脂肪、卵巢和睾丸组织中的变化不显著。这些结果显示,来源于胡麻的*fad3b*基因在转基因小鼠体内可以正常发挥脂肪酸去饱和的功能,显著改变了转基因小鼠体内的多不饱和脂肪酸的组成结构(表4)。

3 讨论

胡麻是我国重要的油料作物,从胡麻籽压榨而来的胡麻油中富含 α -亚麻酸、亚油酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸等各种不饱和脂肪酸^[16]。*Fad3*属于 $\Delta 15$ 脂肪酸脱氢酶,在植物中可以将亚油酸转化为 α 亚麻酸。胡麻中的*fad3*分为a和b两个亚型,基因序列同源性高达95.40%,其中,*fad3b*的活性较强(7.79% vs 5.57%)^[15]。

在临床上已经清楚,n-3多不饱和脂肪酸是哺乳动物神经系统的重要结构组分和营养因子^[17-19],能有效地预防心血管疾病^[20];而过多的n-6多不饱和脂肪酸会促进肿瘤发生和炎症反应^[21]。由于哺乳动物缺少n-3脱氢酶,其合成长链多不饱和脂肪酸的能力很低,n-3多不饱和脂肪酸主要是通过食物摄取^[1]。为了提高哺乳动物体内n-3的水平,研究人员将脂肪酸脱氢酶基因(如*fat1*、*fad2*和*fad3*等)转入小鼠、猪、牛等动物基因组中,制作了能够自主合成n-3多不饱和脂肪酸的动物模型^[6-13]。但是,不同来源的脂肪酸脱氢酶基因改变n-6/n-3的效率是有差异的。用线虫的*fat1*基因制作的转基因小鼠,其n-6/n-3比率降低到对照组小鼠的5%~2%^[7]和18%^[8]。赖良学等^[9]和张鹏等^[22]分别制作的*fat1*转基因猪中,肌肉组织的n-6/n-3比率降低到对照猪的27%和22%。在*fat1*转基因牛,其组织中n-6/n-3比率降低对照牛的6.5%^[11]。在*fat1*转基因羊中发现,n-6/n-3的比值在不同组织中降低的较均匀,肝脏中n-6/n-3只有对照组的42%^[23]。上述研究结果表明,*fat1*基因的转入显著提高了n-6向n-3的转化效率,转基因动物的n-6/n-3比率降低为对照组的20%~40%。但是,当用红亚麻来源的*fad3*基因转染牛肌肉卫星细胞时,n-6/n-3比率只降低为对照组细胞的60%~80%^[14]。本研究发现,在来自胡麻的*fad3b*的转基因细胞中,n-6/n-3比值降低到对照组

的60%,这一结果与Indo等^[14]的结果一致。然而,在*fad3b*转基因小鼠中,不同器官组织中的n-6/n-3比值的降低幅度存在明显的组织器官差异。与对照组相比,转基因小鼠的肝脏、脑、肾脏、肺脏和卵巢以及睾丸中n-6多不饱和脂肪酸比例显著下降,脂肪组织中n-6多不饱和脂肪酸的比例显著上升;n-3多不饱和脂肪酸的比例在骨骼肌中显著增加,而脑、脾脏、卵巢以及睾丸的比例显著下降。与对照组相比,转基因小鼠各器官组织中的n-6/n-3降低为对照小鼠的57%~93%。这一结果与上述提及的*fat1*转基因动物中的n-6/n-3比值的降度达20%~40%相比,存在明显差异。这表明,线虫来源的脂肪酸脱氢酶比植物来源的去饱和能力更强。分析其原因,可能是*fat1*去饱和酶不但可以将LA转化为ALA,还可以将GLA转化为SA(stearidonic acid)、DGLA转化为ETA、AA转化为EPA^[1]。而*fad3*去饱和酶只能完成LA到ALA的转化^[16],*fad3*的功能更单一。但有报道称,虽然*fat1*基因可以引起n-6与n-3的高效转化,但转基因小鼠存在一些健康方面的问题。Pohlmeier等^[24]发现,*fat1*转基因鼠的奶汁中高水平表达n-3多不饱和脂肪酸,但雌鼠的生殖性能显著降低;脂肪特异表达*fat1*的转基因小鼠由于多不饱和脂肪酸含量过高而影响妊娠,最终无法获得纯合的转基因小鼠^[25]。而在本研究中,F0、F1和F2代转基因小鼠的繁殖效率与同种的野生型小鼠一致(数据未公开),而且转基因小鼠的生理与健康状态良好。另外,由于*fad3*基因较*fat1*基因的功能更为专一,因而可能更有利于研究外源基因在动物体内的调控机制。

本研究发现,*fad3b*转基因小鼠的n-6/n-3比值降幅存在明显的组织器官差异。在mRNA水平上,*fad3b*基因在肝脏中的表达量最高,在骨骼肌、脂肪、脑和心脏中的表达量最低,不同组织间的表达差异较明显;在脂肪酸水平上,骨骼肌、脑和肝脏等组织的n-6/n-3比值都有显著降低,而脂肪、卵巢和睾丸组织中的变化不显著,不同组织间的表达也存在明显的差异。虽然*fad3b* mRNA水平在肝脏组织中最高,但其n-6/n-3变化幅度却不是最大的。骨骼肌中*fad3b* mRNA表达量最低,但n-6/n-3变化幅度却是最大的,尤其是DHA含量从3.57%增加到9.48%,增加了2.65倍。这些结果表明,*fad3b*基因在不同组织器官的mRNA与脂肪酸水平上的趋势并不一致。这一现象也存在于张鹏等^[23]报道的*fat1*转基因羊中,

*fat1*在骨骼肌、舌和心脏中表达量较高,脑、肺脏和皮肤中表达量较低。

*Fat1*基因的影响主要发生于骨骼肌。朱贵明等^[8]认为,转基因小鼠骨骼肌中DHA含量增加最多,是野生型的5.16倍。赖良学等^[9]制备的*sfat1*转基因猪的骨骼肌中,n-6/n-3降低到对照猪的27.4%。张鹏等^[22]的*fat1*转基因猪中,只有骨骼肌的n-6/n-3降低最明显。上述结果表明,*fat1*和*fad3b*基因在转基因动物中存在组织器官差异,但均在骨骼肌中表现显著,可能骨骼肌是n-3多不饱和脂肪酸主要发挥功能的组织。*fad3b*转基因小鼠肌肉组织中DHA含量增加较多,DHA可以通过AMPK[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase]和PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor D)信号通路调控线粒体活性,增加骨骼肌的耐力和运动时的氧消耗能力,静息状态时的氧消耗并没有增加^[26-28]。

在*fad3b*转基因小鼠的心脏组织中,DHA和EPA含量都有所增加(28.97% vs 25.90%、0.60% vs 0.52%)。EPA和DHA可以预防心率不齐、降血压、减少甘油三酯、促进血管反应性、增加血小板稳定性、抑制血小板凝集与降低炎症反应等^[29]。ALA含量较非转基因小鼠显著减少(0.67% vs 1.02%)。ALA的作用与EPA和DHA正好相反,对左心室的结构和功能具有一定的作用,提高收缩压、升高血压以及改变左心室的大小、收缩能力、容积和硬度^[30]。EPA和AA是前列腺素、血栓素以及白三烯的前体物质。AA是2型前列腺素和血栓素的前体物质,也是4型白三烯的前体物质。EPA是3型前列腺素和血栓素的前体物质,也是5型白三烯的前体物质。而2型前列腺素会促进心律不齐,3型会抑制心律不齐;2型血栓素可以激活血小板,促进血管收缩,3型血栓素是血小板的抑制剂同时促进血管舒张;4型白三烯促进炎症反应,而5型白三烯具有抗炎的作用。因此,AA是典型的促进炎症,EPA可以抑制炎症^[29]。在*fad3*转基因小鼠中,LA含量较非转基因小鼠显著减少(17.32% vs 19.31%)。LA增多会导致左心室扩张,功能退化^[30]。研究发现,心肌细胞中n-3的增加可能是通过PPAR γ 调控线粒体代谢,肌束消耗O₂的能力显著增强,氧化磷酸化能力增加,抗氧化酶TxnRd2(thioredoxin reductase 2)显著增加,H₂O₂的排放效率明显提升,同时位于线粒体外膜的单胺氧化

酶活性显著降低[ROS(reactive oxygen species)的主要生产者]^[31]。由此可以看出,*fad3b*改变了心脏中多不饱和脂肪酸的组成,促进了心肌细胞的代谢活动,因此有利于心血管健康。

通过以上的分析可以看出,来源于胡麻的*fad3b*基因在转基因小鼠中能够正常发挥脂肪酸去饱和功能,促使n-6向n-3多不饱和脂肪酸转化,显著改变了转基因小鼠的多不饱和脂肪酸的组成和含量。本研究还证实,除*fat1*基因可以用于制备转基因小鼠模型外,*fad3b*基因也是制作体内富含n-3多不饱和脂肪酸小鼠模型的可选基因,而且*fad3b*转基因小鼠模型可能比*fat1*小鼠在专一性、动物生殖健康方面可能更有优势。

参考文献 (References)

- 1 James GW, Jennifer LW, John B. Polyunsaturated fatty acid synthesis: What will they think of next? Trends Biochem Sci 2002; 27(9): 467-73.
- 2 Lopez AD, Garcia MF, Jamison RR, Garrido JA, Vilches MA. Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases. Biochem Systemat Ecol 2003; 31(10): 1111-24.
- 3 Chen Y, Zhang M, Gou K. SDD17 desaturase can convert arachidonic acid to eicosapentaenoic acid in mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 2010; 394(1): 158-62.
- 4 Tocher D, Leaver M, Hodgson P. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. Prog Lipid Res 1998; 37(2/3): 73-117.
- 5 Spychalla JP, Kinney AJ, Broese J. Identification of an animal ω -3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94(4): 1142-7.
- 6 Kang ZB, Ge YL, Chen ZH, Brown JC, Laposata M, Alexander L, 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 2001; 98(7): 4050-4.
- 7 Kang J X, Wang JD, Wu L, Kang ZB. Transgenic mice: Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. Nature 2004; 427(6974): 504.
- 8 Zhu GM, Chen HX, Wu XJ, Zhou YR, Lu JS, Chen H, et al. A modified n-3 fatty acid desaturase gene from *C. briggsae* produces high proportion of DHA and DPA in transgenic mice. Transgenic Res 2008; 17(4): 717-25.
- 9 Lai LX, Kang JX, Li RF, Wang JD, William TW, Yong HY, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. Nat Biotechnol 2006; 24(4): 435-6.
- 10 潘登科, 张莉, 周艳荣, 冯冲, 龙川, 刘晓, 等. 体细胞核移植生产转 ω -3脂肪酸去饱和酶基因*sFat-1*克隆猪. 中国科学 [Pan Dengke, Zhang Li, Zhou Rongyan, Feng Chong, Long Chuan, Liu Xiao, et al. Production of ω -3 fatty acid desaturase gene (*sFat-1*) transgenic pig by somatic cell nuclear transfer. Science in China] 2009; 3: 295-302.
- 11 Wu X, Ouyang H, Duan B, Pang DX, Zhang L, Yuan T, et al. Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. Transgenic Res 2012; 21(3): 537-43.

- 12 Sacki K, Matsumoto K, Kinoshita M, Suzuki I, Tasaka Y, Kano K, *et al.* Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(17): 6361-6.
- 13 Chen Y, Mei M, Zhang P, Ma KY, Song GQ, Ma X, *et al.* The generation of transgenic mice with Fat1 and Fad2 genes that have their own polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32(3): 523-32.
- 14 Indo Y, Tatemizo A, Abe Y. Functional expression of a humanized gene for an omega-3 fatty acid desaturase from scarlet flax in transfected bovine adipocytes and bovine embryos cloned from the cells. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791(3): 183-90.
- 15 万艳, 李丽玲, 陈小佳. 应用实时荧光定量PCR检测外源基因拷贝数的新方法. 暨南大学学报(自然科学版)[Wan Yan, Li Liling, Chen Xiaojia. A new method to determine the copy numbers of exogenous gene by absolute quantitative Real-time PCR assay. *Journal of Jinan University (Natural Science)* 2009; 30(3): 310-3.
- 16 Vrinten P, Hu ZY, Munchinsky MA, Rowland G, Qiu X. Two FAD3 desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed. *Plant Physiol* 2005; 139(1): 79-87.
- 17 Polit L, Rotstein N, Carri N. Effects of docosahexenoic acid on retinal development: Cellular and molecular aspects. *Lipids* 2001; 36(9): 927-35.
- 18 Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Mol Neurobiol* 2011; 44(2): 203-215.
- 19 Kawakita E, Hashimoto M, Shido O. Docosahexenoic acid promotes neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience* 2006; 139: 991-7.
- 20 Delgado LJ, Perez MP, Lopez MJ, Perez JF. Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: A systematic review. *Br Nutr* 2012; 107(Suppl 2): S201-13.
- 21 Suh M, Sauv e Y, Merrells KJ, Kang JX, Ma DW. Supranormal electroretinogram in *fat-1* mice with retinas enriched in docosahexaenoic acid and n-3 very long chain fatty acids (C24-C36). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(9): 4394-401.
- 22 Zhang P, Zhang YD, Dou HW, Yin JD, Chen Y, Pang XZ, *et al.* Handmade cloned transgenic piglets expressing the nematode Fat-1 gene. *Cell Reprogram* 2012; 14(3): 258-66.
- 23 Zhang P, Liu P, Dou H, Chen L. Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 fatty acids. *PLoS One* 2013; 8(2): e55941.
- 24 Pohlmeier WE, Hovey RC, Van Eenennaam AL. Reproductive abnormalities in mice expressing omega-3 fatty acid desaturase in their mammary glands. *Transgenic Res* 2011; 20: 283-92.
- 25 Ji S, Hardy RW, Wood PA. Transgenic expression of n-3 fatty acid desaturase (*fat-1*) in C57/BL6 mice: Effects on glucose homeostasis and body weight. *J Cell Biochem* 2009; 107(4): 809-17.
- 26 Johnson ML, Lalia AZ, Dasari S, Pallauf M, Fitch M, Marc K, *et al.* Eicosapentaenoic acid but not docosahexaenoic acid restores skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity in old mice. *Aging Cell* 2015; 14(5): 734-43.
- 27 Le GM, Chat e V, Hininger FI, Laillet B, Morio B, Pieroni G, *et al.* A 9-week docosahexaenoic acid-enriched supplementation improves endurance exercise capacity and skeletal muscle mitochondrial function in adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 310(3): E213-24.
- 28 Peoples GE, McLennan PL. Dietary fish oil reduces skeletal muscle oxygen consumption, provides fatigue resistance and improves contractile recovery in the rat *in vivo* hindlimb. *Br Nutr* 2010; 104(12): 1771-9.
- 29 Janssen CF, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Proq Lipid Res* 2014; 53: 1-17.
- 30 Poudyal H, Brown L. Should the pharmacological actions of dietary fatty acids in cardiometabolic disorders be classified based on biological or chemical function? *Proq Lipid Res* 2015; 59: 172-200.
- 31 Anderson EJ, Thayne KA, Harris M, Shaikh SR, Darden TM, Lark DS, *et al.* Do fish oil omega-3 fatty acids enhance antioxidant capacity and mitochondrial fatty acid oxidation in human atrial myocardium via PPARc activation? *Antioxid Redox Signal* 2014; 21(8): 1156-63.