

文章编号: 1004-7220(2022)03-0433-08

# $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸对树突状细胞生物物理学特性及迁移能力的影响

王欢欢<sup>a,b</sup>, 曾柱<sup>a</sup>, 胡祖权<sup>b</sup>, 宋萍萍<sup>b</sup>

(贵州医科大学 a.基础医学院; b.生物与工程学院, 生物与医学工程重点实验室, 贵阳 550025)

**摘要:**目的 从生物物理学与免疫学交叉角度,分析二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)对鼠源树突状细胞(dendritic cells, DCs)生物物理学特性、细胞骨架及迁移能力的影响,探讨 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸( $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids,  $\omega$ -3 PUFAs)对DCs免疫功能的影响及其潜在作用机制。**方法** 分离C57BL/6J小鼠骨髓来源单核细胞,经20 ng/mL重组鼠集落刺激因子(recombinant mouse granulocyte macrophage colony stimulating factor, rmGM-CSF)和10 ng/mL重组鼠白介素-4(recombinant mouse interleukin-4, rmIL-4)诱导分化为未成熟树突状细胞(imature dendritic cells, imDCs),第6天加入100 ng/mL脂多糖诱导为成熟树突状细胞(mature dendritic cells, mDCs),进一步对imDCs及mDCs进行形态学观察及CD11c阳性率分析;通过细胞增殖检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)及流式细胞仪检测不同浓度EPA和DHA(浓度均为0~60  $\mu$ mol/L)作用下DCs细胞活力及凋亡情况;在确定最佳作用浓度后分别通过荧光偏振法、细胞电泳法及浓度梯度法检测分析DCs的膜流动性、电泳迁移率(electrophoretic mobility, EPM)及渗透脆性变化,并用免疫荧光法检测其细胞骨架纤维状肌动蛋白(filamentous actin, F-actin)表达,最后利用Transwell系统检测DCs迁移能力。**结果** imDCs及mDCs的CD11c阳性率均在80%左右;不同浓度EPA和DHA均呈剂量依赖性降低DCs细胞活力,但并没有诱导其凋亡。在50  $\mu$ mol/L EPA和DHA作用下,DCs生物物理学特性均发生改变,其中渗透脆性和EPM明显下降,膜流动性明显增大。DCs细胞骨架F-actin含量表达均明显上升,迁移率显著下降。**结论**  $\omega$ -3 PUFAs可能会通过改变DCs细胞骨架结构及生物物理学特性,抑制细胞迁移能力,进而影响其免疫功能。

**关键词:**  $\omega$ -3多不饱和脂肪酸;树突状细胞;生物物理学特性;细胞迁移;细胞骨架

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.03.008

## Effects of $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids on Biophysical Properties and Migration of Dendritic Cells

WANG Huanhuan<sup>a,b</sup>, ZENG Zhu<sup>a</sup>, HU Zuquan<sup>b</sup>, SONG Pingping<sup>b</sup>

(a. School of Basic Medicine; b. Key Laboratory of Biological and Medical Engineering, School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guizhou 550025, China)

**Abstract: Objective** From the perspective of biophysics and immunology, the effects of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) on biophysical characteristics, cytoskeleton and migration ability of mouse derived dendritic cells (DCs) were analyzed, so as to explore the effect of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids

收稿日期: 2021-05-06; 修回日期: 2021-07-29

基金项目: 贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合KY字2015-436号), 贵州省科技合作计划项目(黔教合LH字2015-7323, 19NSP064), 贵州省卫健委科技项目(gzkwkj2021-530)

通信作者: 宋萍萍, 副教授, E-mail: songqian70@163.com

( $\omega$ -3 PUFAs) on immune function of DCs and its potential mechanism. **Methods** The bone marrow-derived monocytes from C57BL/6J mice were isolated and induced to differentiate into immature dendritic cells (imDCs) by 20 ng/mL recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rmGM-CSF) and 10 ng/mL recombinant mouse interleukin-4 (rmlL-4). After 6 days, 100 ng/mL lipopolysaccharide was added to induce mature dendritic cells (mDCs). Further the morphological observation and positive rate of CD11c in imDCs and mDCs were analyzed. Then at different concentrations of EPA and DHA (0-60  $\mu$ mol/L), the cell viability and apoptosis of DCs were detected by cell counting kit-8 (CCK-8) kit and flow cytometry. After the optimal concentration of EPA and DHA were determined, the changes of the membrane fluidity, electrophoretic mobility (EPM) and osmotic fragility of DCs were separately detected by the fluorescence polarization, cell electrophoresis and concentration gradient. The expression of filamentous actin (F-actin) was detected by the immunofluorescence. Finally, the migration ability of DCs was detected by the Transwell system. **Results** The positive rate of CD11c in DCs was about 80%. The viability of DCs decreased in a dose-dependent manner under the action of EPA and DHA of different concentrations, which didn't induce the apoptosis of DCs. Under the action of 50  $\mu$ mol/L EPA and DHA, the osmotic fragility and EPM of DCs significantly decreased, and the membrane fluidity significantly increased. The expression of F-actin in DCs obviously increased, and the migration rate of cells obviously decreased. **Conclusions**  $\omega$ -3 PUFAs may affect the cytoskeleton structure and biophysical characteristics of DCs, inhibit the migration, and then affect its immune function.

**Key words:**  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids ( $\omega$ -3 PUFAs); dendritic cells; biophysical properties; cell migration; cytoskeleton

$\omega$ -3 多不饱和脂肪酸( $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids,  $\omega$ -3 PUFAs)作为人体必需脂肪酸之一,主要源于海洋微藻及深海鱼;其中二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)是其两种活性形式。 $\omega$ -3 PUFAs具有改善移植器官功能、延长存活时间及减少排斥反应等功能,在防治自身性免疫疾病和移植物排斥反应方面发挥着重要作用。目前市场上大多免疫抑制剂缺少选择性及特异性,会引起机体不良反应,故寻找新型免疫抑制剂极其必要<sup>[1]</sup>。研究发现, $\omega$ -3 PUFAs可抑制鼠源T细胞(t-lymphocytes, T cells)增殖,影响其迁移能力及趋化因子受体表达,导致调节性T细胞类型的T细胞功能下降<sup>[2]</sup>。通过体外刺激或膳食补充, $\omega$ -3 PUFAs可整合到免疫细胞膜上,改变脂肪酸的组成,从而影响其免疫功能的发挥,如吞噬能力和抗原提呈能力<sup>[3]</sup>。但目前 $\omega$ -3 PUFAs对免疫细胞的具体作用机制尚不清楚。

DCs是目前已知功能最强大的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC),从其发育状态来看,可分为未成熟树突状细胞(imature dendritic cells, imDCs)和成熟树突状细胞(mature dendritic

cells, mDCs)。DCs表面有很多树枝状的突起,imDCs的突起短而稀疏,而mDCs的突起长且密集。外周组织中的imDCs在捕获抗原后,逐渐分化为mDCs并向次级淋巴结迁移,与原始T细胞相互作用以启动免疫反应。在此过程中,共刺激分子和趋化因子受体表达增加,DCs抗原提呈能力及迁移能力增强<sup>[4]</sup>;同时,DCs的渗透脆性、电泳迁移率(electrophoretic mobility, EPM)及膜流动性等生物物理学特性发生改变,影响其免疫功能的发挥<sup>[5-6]</sup>。研究发现, $\omega$ -3 PUFAs可降低人源和鼠源DCs细胞因子和共刺激分子的表达,抑制T细胞活化,最终影响免疫功能发挥<sup>[7-8]</sup>。喂食小鼠 $\omega$ -3 PUFA后,其鼠源T细胞增殖受到明显抑制<sup>[9]</sup>。

细胞骨架重构在细胞运动和功能发挥着重要作用<sup>[10]</sup>。细胞骨架是一种高度动态的结构体系,主要包括微丝、微管和中间丝;微丝由肌动蛋白单体组成,又称纤维状肌动蛋白(filamentous actin, F-actin)。当F-actin重塑时,能在多种肌动蛋白结合蛋白(actin binding protein, ABP)参与下持续进行组装和去组装,以满足不同分化阶段、细胞周期时相、运动状态及微环境中细胞功能改变的需要<sup>[11]</sup>。研究发现,当DCs与T细胞接触时,F-actin

聚合使细胞形态及 T 细胞活化受到影响,最终影响免疫应答<sup>[10,12]</sup>。

鉴于细胞的生物物理性质与其功能密切相关,而细胞骨架重塑是细胞运动的基础,本文从生物物理学与免疫学的交叉角度,以鼠源 imDCs 及 mDCs 为研究对象,分析  $\omega$ -3 PUFAs 作用下 DCs 生物物理学特性、细胞骨架 F-actin 及迁移能力的变化。研究结果将为  $\omega$ -3 PUFAs 对 DCs 免疫功能的影响机制提供理论支持,也为器官移植领域中免疫抑制剂使用或替代提供可能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料、试剂及仪器

**1.1.1 实验动物** SPF 级 6~10 周 C57BL/6J 小鼠购自贵州医科大学动物实验中心(有合格证),饲养于贵州医科大学生物与医学工程重点实验室。

**1.1.2 主要试剂** 脂多糖、红细胞裂解液、CCK-8 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;RPIM1640 培养基购自美国 Gibico 公司;rmGM-CSF、rmIL-4 购自美国 Biologend 公司;胎牛血清购自美国 SERANA 公司;TMA-DPH 试剂盒购自武汉艾美捷科技有限公司;Annexin V-FITC 试剂盒购自上海爱必信科技有限公司;罗丹明标记的鬼笔环肽购自美国 Thermo-Fisher Scientific 公司;EPA、DHA 购自上海源叶生物科技有限公司。

**1.1.3 主要仪器** 流式细胞仪购自美国 BD 公司;Cytation 5 细胞成像多功能检测系统购自美国 Bio Tek 公司;激光共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司。

### 1.2 小鼠骨髓来源单核细胞分离

选取 8~10 周 C57BL/6J 小鼠,处死后无菌环境分离股骨及胫骨,75%酒精及 PBS 洗涤后吹打出骨髓混匀,70  $\mu$ m 细胞筛过滤后使用红细胞裂解液室温裂解;后用含 15% 血清的 1640 培养基终止裂解,PBS 洗涤即获得骨髓细胞。

### 1.3 DCs 的诱导获取

以  $2 \times 10^6$  个/mL 细胞重悬于 1640 培养基(含 15% 血清、1% 青霉素-链霉素和 0.1%  $\beta$ -巯基乙醇),使用 20 ng/mL rmGM-CSF 和 10 ng/mL rmIL-4 诱导,于 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 培养箱培养,隔日半换液,第 6 d 收集悬浮细胞即得 imDCs;imDCs 中加 100 ng/mL 脂

多糖继续培养 24 h 即获得 mDCs。

### 1.4 DCs 鉴定

使用 Cytation 5 于 200 $\times$ 倍镜下观察 DCs 形态,后调整细胞数为  $1 \times 10^6$  个/mL,PBS 洗涤后 4% 多聚甲醛固定,使用 1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)及 0.2 mg/mL CD11c-APC 荧光标记抗体混匀孵育,结束后 PBS 洗涤并重悬。流式细胞仪检测后 FlowJo 软件分析。

### 1.5 EPA、DHA 处理 DCs

调整细胞数为  $1 \times 10^6$  个/mL,设置 0~60  $\mu$ mol/L 浓度梯度处理 DCs,于 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 24、48 h;其中 EPA 处理组和 DHA 处理组(EPA 及 DHA 皆使用 50% 乙醇配制)为实验组,50% 乙醇组为对照组。确认最佳浓度后按上述步骤进行分组及处理。

### 1.6 细胞活力检测

调整细胞数为  $1 \times 10^6$  个/mL,96 孔板中接种细胞悬液,CCK-8 法及酶标仪检测 OD<sub>450 nm</sub> 值。细胞存活率根据下式计算:

$$\text{细胞活力} = \frac{A_{\text{处理组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

### 1.7 细胞凋亡检测

调整细胞数为  $2 \times 10^6$  个/mL,预冷 PBS 洗涤后用  $1 \times$ binding buffer 重悬,使用 AnnexinV-FITC 荧光抗体室温避光孵育;上机前补加 3,8-二氨基-5-[3-(二乙基氨基)丙基]-6-苯基吡啶二碘(PI)染液及  $1 \times$ binding buffer。流式细胞仪检测后 FlowJo 软件分析。

### 1.8 生物物理学特性检测

**1.8.1 渗透脆性** 配制不同渗透压的渗透液备用,调整细胞数为  $1 \times 10^6$  个/mL。96 孔板每孔接种不同渗透液处理细胞 30 min,后通过 CCK-8 法及酶标仪检测 OD<sub>450 nm</sub> 值。未破损细胞百分比根据下式计算:

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{处理组}}}{A_{\text{对照组}}} \times 100\%$$

**1.8.2 EPM** 调整细胞数为  $1 \times 10^5$  个/mL,PBS 洗涤后 10% 蔗糖溶液重悬,将细胞悬液加载到细胞电泳小室内。记录细胞电泳的距离、时间及加载电压。EPM 的计算公式如下:

$$\text{EPM} = \frac{S}{tV}$$

式中:  $S$  为电泳距离,  $t$  为电泳时间,  $V$  为加载电压。可见 EPM 与细胞膜表面负电荷数量成正比。

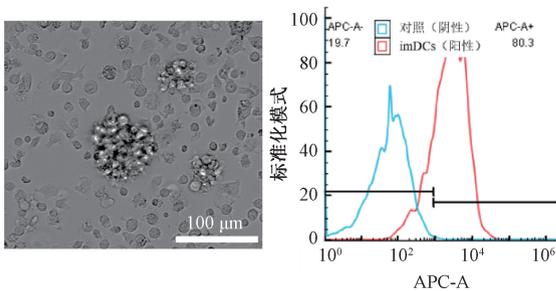
**1.8.3 膜流动性** 调整细胞数为  $2 \times 10^6$  个/mL, PBS 洗涤后培养基重悬, 后用  $20 \mu\text{mol/L}$  1,6-二苯基 1,3,5-己三烯(DPH)避光孵育, 结束后 PBS 洗涤细胞并重悬, 荧光光谱仪检测不同偏振度下的荧光偏振值( $P$ )。荧光光谱仪参数设置如下: 激发波长为  $355 \text{ nm}$ 、发射波长为  $430 \text{ nm}$ 、夹缝宽度为  $10 \text{ nm}$ 、激发电压为  $400 \text{ V}$ 、时间扫描为  $10 \text{ s}$ 。荧光偏振值的公式计算如下:

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}} \quad \left( G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \right)$$

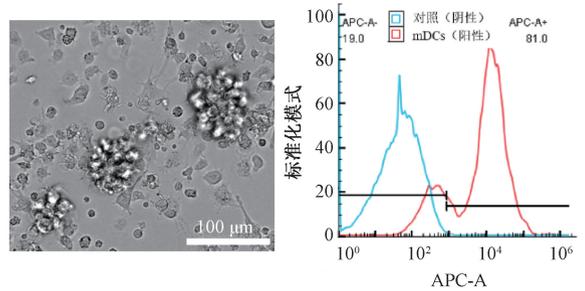
可见  $P$  与细胞膜脂双层分子的流动性成反比。

## 1.9 细胞骨架 F-actin 检测

调整细胞数为  $2 \times 10^5$  个/mL, 4% 多聚甲醛固定, PBS 洗涤后 0.1% Tritonx-100 渗透, 室温下用 1% BSA 封闭; 避光用罗丹明标记的鬼笔环肽于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  避光孵育 2 h, 后 PBS 洗涤, 使用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI)溶液及抗荧光猝灭剂后进行封片。激光共聚焦显微镜  $488 \text{ nm}$  处扫描拍照, Image J 图像分析系统分析罗丹明荧光的表达, 其中



(a) 未成熟树突状细胞



(b) 成熟树突状细胞

图1 不同成熟状态下 DCs 形态学及 CD11c 阳性率表达

Fig.1 Morphology and positive rate of CD11c in DCs with different maturity (a) imDCs, (b) mDCs

## 2.2 $\omega$ -3 PUFAs 对 DCs 细胞活力的影响

通过 CCK-8 法及酶标仪, 分别检测 EPA 和 DHA 作用下 DCs 细胞活力的变化。EPA 和 DHA (浓度均为  $0 \sim 60 \mu\text{mol/L}$ ) 作用下, 与对照组相比, 在  $0 \sim 20 \mu\text{mol/L}$  浓度下 EPA 和 DHA 并不影响 DCs 细胞活力, 而在  $40 \sim 60 \mu\text{mol/L}$  浓度下

平均荧光强度代表细胞 F-actin 含量。

## 1.10 迁移能力检测

调整细胞数为  $5 \times 10^5$  个/mL, 使用  $8 \mu\text{m}$  Transwell 系统, 下室接种原培养基, 上室接种细胞悬液, 于  $5\% \text{ CO}_2$ 、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养箱继续培养, 24 h 后收集上下室细胞。CCK-8 法及酶标仪检测  $OD_{450 \text{ nm}}$  值, 迁移速率根据下式计算:

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{下室}}}{A_{\text{上室}} + A_{\text{下室}}} \times 100\%$$

## 1.11 统计学分析

采用 SAS 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析统计绘图, 每个实验至少重复 3 次, 两组间采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学显著性,  $P < 0.01$  为差异具有高度显著性。

## 2 结果

### 2.1 不同成熟状态下, DCs 形态学及 CD11c 阳性率表达

通过 Cytation 5 观察 imDCs 及 mDCs 细胞形态。DCs 均呈集落状生长, 其中 imDCs 表面有不规则突起, 而 mDCs 表面有不规则的、长度较长的突起。通过流式细胞法检测 imDCs 及 mDCs 中 CD11c 的表达, 其 CD11c 阳性率均为 80% 左右 (见图 1)。

EPA 和 DHA 皆呈剂量依赖性降低 DCs 细胞活力 (见图 2)。

### 2.3 $\omega$ -3 PUFAs 对 DCs 凋亡的影响

通过 AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒检测及流式细胞法, 分别检测 EPA 和 DHA 作用下 DCs 的凋亡情况。其中, 横轴和纵轴分别为 AnnexinV-FITC

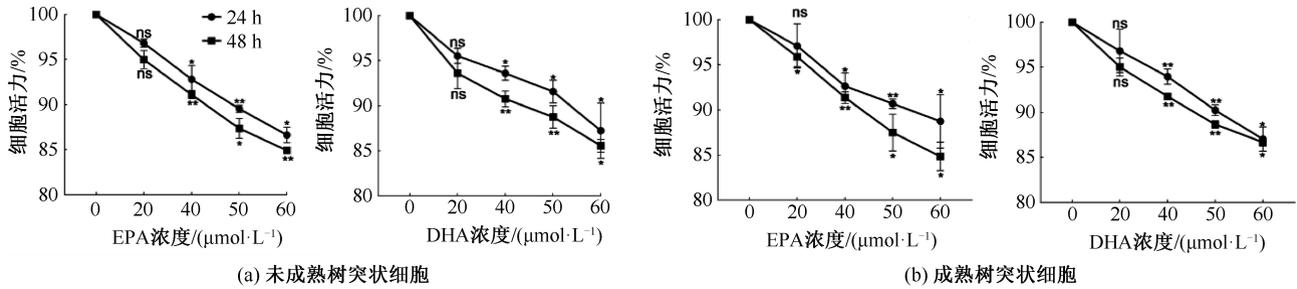


图2 不同浓度 EPA 和 DHA 作用下 DCs 细胞活力的变化

Fig.2 Cell viability of DCs under the action of EPA and DHA at different concentrations (a) imDCs, (b) mDCs

注:与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ns:无显著性差异。

通道和 PI 通道, Q1 为坏死细胞群, Q2 和 Q3 为凋亡细胞群, Q4 为活细胞群。在 EPA 和 DHA (浓度均

为 0~60  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用下, imDCs 和 mDCs 均未发生凋亡 (见图 3)。

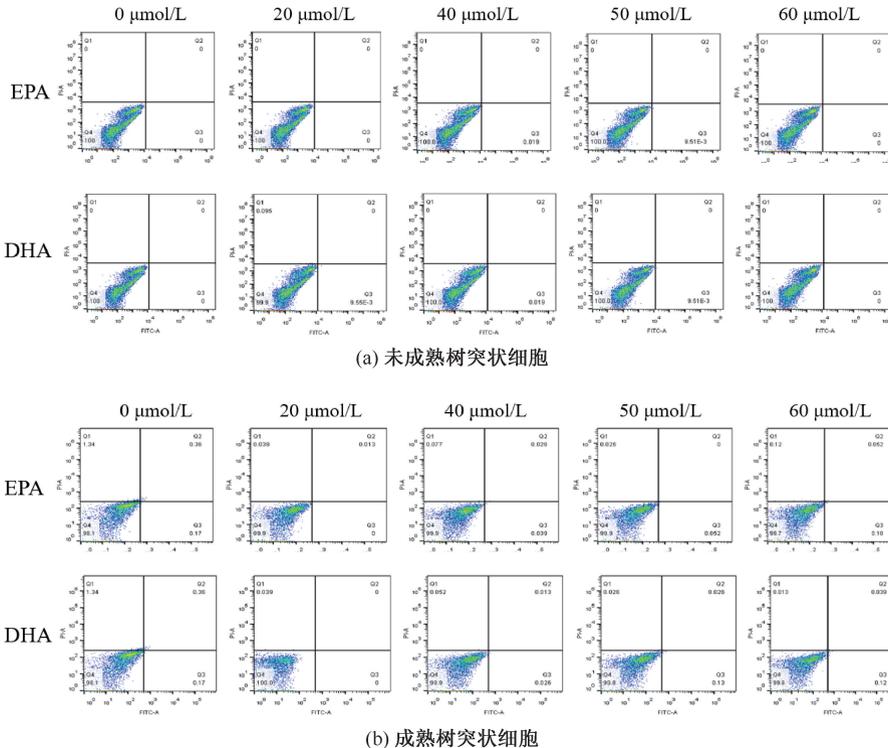


图3 不同浓度 EPA 和 DHA 作用下 DCs 凋亡情况比较

Fig.3 Comparison of apoptosis for DCs under the action of EPA and DHA at different concentrations (a) imDCs, (b) mDCs

注: Q1 包含坏死 (AnnexinV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) 细胞群, Q2 包含晚期凋亡 (AnnexinV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) 细胞群, Q3 包含早期凋亡 (AnnexinV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) 细胞群, Q4 包含活 (AnnexinV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) 细胞群。

## 2.4 $\omega$ -3 PUFAs 对 DCs 生物物理特性的影响

通过不同渗透压的渗透液、10% 蔗糖处理及 TMA-DPH 试剂盒, 分别检测 EPA 和 DHA 作用下 DCs 渗透脆性、EPM 及膜流动性的变化。EPA 和 DHA (浓度均

为 50  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用下, 与渗透压 295 mOsm/kg (等渗组) 及对照组相比, 在渗透压 175、55 mOsm/kg 时, imDCs 及 mDCs 的渗透脆性明显减小, 同时 EPM 明显降低, 而膜流动性明显增大 (见图 4)。

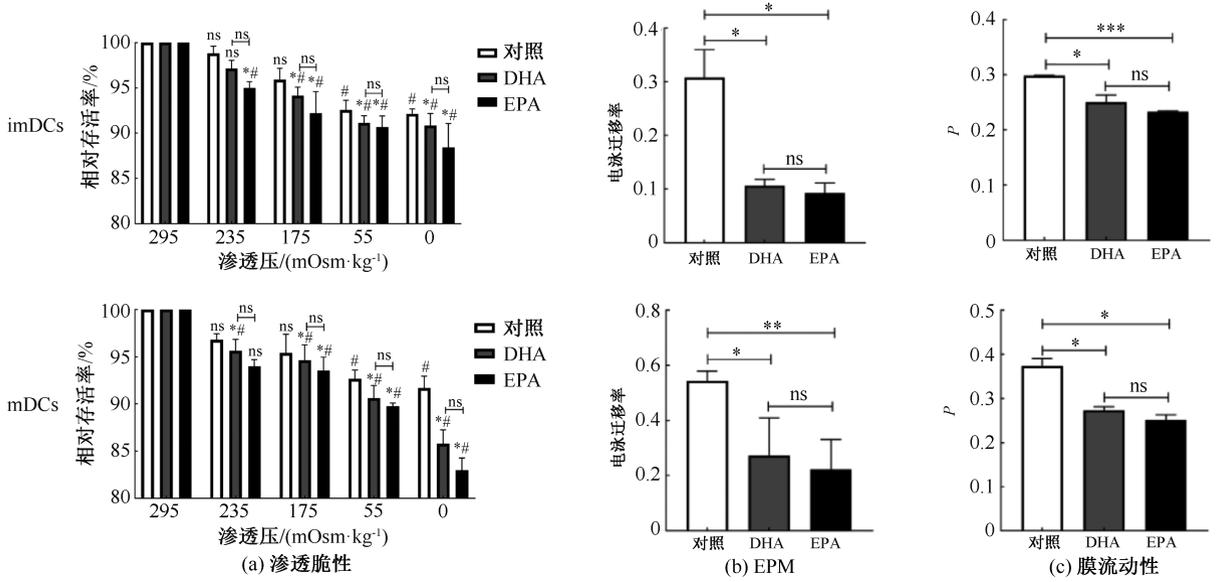


图4 50 μmol/LEPA 和 DHA 作用下 DCs 生物物理学特性比较

Fig.4 Comparison of biophysical properties for DCs under the action of EPA and DHA at concentration of 50 μmol/L

(a) Osmotic fragility, (b) EPM, (c) Fluidity

注:与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与 295 mOsm/kg 相比, # $P < 0.05$ , ns:无显著性差异。

## 2.5 ω-3 PUFAs 对 DCs 细胞骨架的影响

通过激光共聚焦显微镜及 Image J 图像分析系统,分别检测 EPA 和 DHA 作用下 DCs 罗丹明荧光的表达。在 EPA 和 DHA (浓度均为

50 μmol/L) 作用下,与对照组相比, imDCs 及 mDCs 胞体面积明显增大,同时 F-actin 表达明显增加;其中 EPA 处理组胞体面积显著性大于 DHA 处理组(见图 5)。

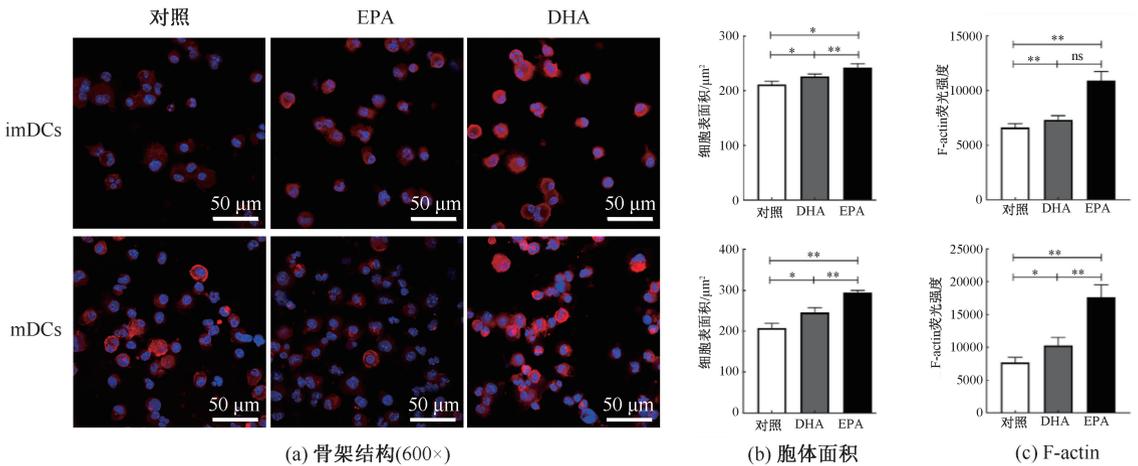


图5 50 μmol/L EPA 和 DHA 作用下 DCs 细胞骨架结构比较

Fig.5 Comparison of Cytoskeleton structure for DCs under the action of EPA and DHA at concentration of 50 μmol/L

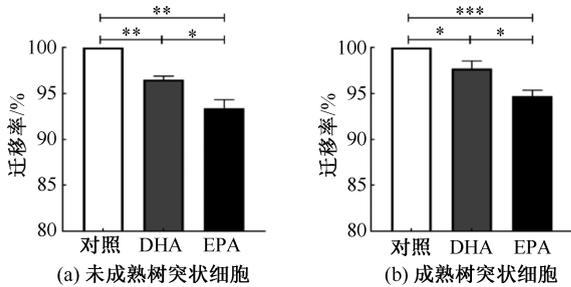
(a) Skeleton structure, (b) Body area, (c) F-actin

注:与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ns:无显著性差异。

## 2.6 ω-3 PUFAs 对 DCs 迁移能力的影响

通过 Transwell 系统及 CCK-8 法,分别检测 EPA 和 DHA 作用下 DCs 迁移能力的变化。在 EPA 和

DHA(浓度均为 50 μmol/L)作用下,与对照组相比, imDCs 迁移率及 mDCs 迁移率显著下降;且 EPA 处理组迁移率皆明显低于 DHA 组(见图 6)。

图6 50  $\mu$ mol/L EPA 和 DHA 作用下 DCs 迁移能力比较Fig.6 Comparison of migration for DCs under the action of EPA and DHA at concentration of 50  $\mu$ mol/L

(a) imDCs, (b) mDCs

注:与对照组相比,\* $P$ <0.05,\*\* $P$ <0.01,ns:无显著性差异。

### 3 讨论

$\omega$ -3 PUFAs 作为人体必需脂肪酸,可影响细胞膜结构及免疫细胞的活化。研究发现, $\omega$ -3 PUFAs 可抑制巨噬细胞的吞噬能力及细胞因子分泌,显著改变其微小核糖核酸表达谱<sup>[1]</sup>。而 DCs 是目前已知功能最强大的 APC,处于启动、调控及维持免疫应答的中心环节<sup>[4]</sup>。细胞生物物理学特性的改变会影响其免疫功能发挥,而细胞骨架 F-actin 活化则是其运动的基础<sup>[5]</sup>。本实验中,在 50  $\mu$ mol/L  $\omega$ -3 PUFAs 作用下,鼠源 imDCs 及 mDCs 的生物物理学特性、细胞骨架 F-actin 及迁移能力均发生明显变化。

形态学上,DCs 表面的典型特征是不规则树突样突起,但无特异性标记分子。因此,小鼠骨髓来源 DCs 可通过形态学观察及 CD11c 阳性率表达等特征进行组合鉴定<sup>[13-14]</sup>。本实验中 DCs 表面均有不规则突起,mDCs 细胞表面突起比 imDCs 多且长。两者的 CD11c 阳性率均在 80% 左右的。Liu 等<sup>[13]</sup>研究发现,小鼠骨髓来源 DCs 的 CD11c 阳性率可达到 70%~85% 左右,该结果与本实验结果是一致的。

特定条件下, $\omega$ -3 PUFAs 可能通过改变细胞的生物物理特性,进而诱导其凋亡。研究发现,在 250  $\mu$ mol/L  $\omega$ -3 PUFAs 作用下,人前脂肪细胞生长被抑制甚至发生凋亡<sup>[15]</sup>;而 60  $\mu$ mol/L  $\omega$ -3 PUFAs 可抑制人早幼粒白血病细胞生长并诱导其凋亡<sup>[16]</sup>。也有研究表明,鱼藤酮可促进神经祖细胞凋亡,原因可能是其膜流动性及黏附力等生物物理特性减弱<sup>[17]</sup>。本实验表明,EPA 和 DHA 均呈浓度依赖性降低 DCs 活力,同时生物物理学特性弱化,但没有诱导其凋亡。Hu 等<sup>[10]</sup>研究发现,血管内皮生长因

子可影响人源 mDCs 生物物理特性,但并没有诱导其发生凋亡。由此看出,不同机体环境下细胞可能对 EPA 和 DHA 的应答机制不同,而不同浓度 EPA 和 DHA 作用下细胞的反应状态也有很大差异。

细胞的生物物理学特性主要体现在渗透脆性、EPM 及膜流动性等方面,它们与细胞结构和功能密切相关。渗透脆性是指细胞对不同渗透压抵抗的能力,正常细胞在渗透压较低的溶液中有抗低渗性;EPM 是指恒定电场下细胞的运动速率,反映细胞膜表面电荷密度的分布<sup>[18]</sup>;细胞膜流动性是指细胞膜或合成脂膜的脂质双层的黏度,这直接影响细胞功能<sup>[19]</sup>。研究发现,伏马菌素 B1 可降低人脐静脉内皮细胞的渗透脆性、EPM 和膜流动性,从而使其迁移能力受到抑制<sup>[20]</sup>。本实验结果表明, $\omega$ -3 PUFAs 使 DCs 渗透脆性明显降低,EPM 明显下降,而膜流动性明显增大,同时迁移能力显著受到抑制。另有研究发现,转化生长因子- $\beta$ 1 会使人源 mDCs 渗透脆性及 EPM 降低,而膜流动性增大,最终导致 mDCs 迁移能力受到抑制<sup>[21]</sup>。由此看出, $\omega$ -3 PUFAs 可能通过改变 DCs 生物物理学特性,影响其迁移能力,最终影响免疫功能发挥。

细胞骨架 F-actin 在细胞形态、细胞黏附及细胞运动等过程发挥极其重要作用。研究发现,DCs 细胞骨架 F-actin 的聚合与多种 ABP 相关,这会影响细胞的抗原捕获、迁移效率及免疫突触形成<sup>[22]</sup>。而 DCs 迁移受到两个肌动蛋白池调控:小 R 蛋白家族 A-哺乳动物膈肌相关成蛋白 1 及细胞分裂控制蛋白 42 同源物-肌动蛋白相关蛋白 2/3<sup>[23]</sup>。本实验表明,50  $\mu$ mol/L  $\omega$ -3 PUFAs 作用下 DCs 的 F-actin 表达明显上调,同时其迁移能力显著下降。有研究发现,胞外酸中毒可降低鼠源 imDCs 的 F-actin 表达,最终导致其迁移能力受到抑制<sup>[24]</sup>。由此看出, $\omega$ -3 PUFAs 可能通过调控 F-actin 聚合,影响其迁移能力,进而影响 DCs 的免疫功能。

### 4 结论

特定浓度下  $\omega$ -3 PUFAs 可能通过改变 DCs 的生物物理特性及细胞骨架结构,抑制其迁移能力,从而影响 DCs 的免疫功能。本文研究结果为深入理解  $\omega$ -3 PUFAs 对 DCs 免疫功能的影响机制提供了基础理论支持。

## 参考文献:

- [ 1 ] PAROLINI C. Effects of fish n-3 PUFAs on Intestinal microbiota and immune system [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17 (6): 374-401.
- [ 2 ] GUTIÉRREZ S, SVAHN SL, JOHANSSON ME. Effects of omega-3 fatty acids on immune cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5028-5049.
- [ 3 ] ZALOGA GP. Narrative review of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation upon immune functions, resolution molecules and lipid peroxidation [J]. *Nutrients*, 2021, 13 (2): 662-692.
- [ 4 ] DURAI V, MURPHY KM. Functions of murine dendritic cells [J]. *Immunity*, 2016, 45(4): 719-736.
- [ 5 ] ZENG Z, XU X, ZHANG Y, *et al.* Tumor-derived factors impaired motility and immune functions of dendritic cells through derangement of biophysical characteristics and reorganization of cytoskeleton [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2007, 64(3): 186-198.
- [ 6 ] 王克玲, 郭力, 施荣富, 等. 成熟与未成熟小鼠树突状细胞的生物免疫学特性研究[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(45): 3225-3238.
- [ 7 ] LILLEBERG HS, CICHOSZ SL, SVENSSON M, *et al.* The effect of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on heart rate variability in renal transplant recipients: A randomized controlled trial [J]. *Nutrients*, 2019, 11(12): 2847-2458.
- [ 8 ] 汪灏, 李秋荣, 郝群, 等.  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸对树突状细胞表型和功能的抑制作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(12): 1427-1429.
- [ 9 ] UCHI SH, YANAI R, KOBAYASHI M, *et al.* Dendritic cells mediate the anti-inflammatory action of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in experimental autoimmune uveitis [J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0219405.
- [ 10 ] HU ZQ, XUE H, ZENG Z, *et al.* Biophysical properties and motility of human mature dendritic cells deteriorated by vascular endothelial growth factor through cytoskeleton remodeling [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11): 1756-1772.
- [ 11 ] 危当恒, 王贵学, 黄华, 等. 低密度脂蛋白对血管内皮细胞骨架及粘附能力的影响[J]. *医用生物力学*, 2006, 21(2): 105-110.
- [ 12 ] CURRELI S, WONG BS, LATINOVIC O, *et al.* Class 3 semaphorins induce F-actin reorganization in human dendritic cells: Role in cell migration [J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 100(6): 1323-1334.
- [ 13 ] LIU X M, XIA X, WANG X, *et al.* Tropomodulin expression increases upon maturation in dendritic cells and promotes their maturation and immune functions [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 587441.
- [ 14 ] IMMIG K, GERICKE M, MENZEL F, *et al.* CD11c-positive cells from brain, spleen, lung, and liver exhibit site-specific immune phenotypes and plastically adapt to new environments [J]. *Glia*, 2015, 63(4): 611-625.
- [ 15 ] HANADA H, MORIKAWA K, HIROTA K, *et al.* Induction of apoptosis and lipogenesis in human preadipocyte cell line by n-3 PUFAs [J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(1): 51-59.
- [ 16 ] KAYO A, HIROTSUGU K, TOSHIIHIKO U, *et al.* Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 62(7): 821-828.
- [ 17 ] MAHAJAN G, LEE MY, KOTHAPALLI C. Biophysical and biomechanical properties of neural progenitor cells as indicators of developmental neurotoxicity [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(10): 2979-2992.
- [ 18 ] 石玉玲, 胡祖权, 王赞, 等. 渗透压对未成熟树突状细胞生物力学特性和免疫学功能的影响[J]. *医用生物力学*, 2020, 35(2): 202-207.
- [ 19 ] SHI YL, HU ZQ, WANG Y, *et al.* Effects of osmotic pressure on biomechanical properties and immune functions of immature dendritic cells [J]. *J Med Biomech*, 2020, 35(2): 202-207.
- [ 20 ] NICOLSON GL. The fluid-mosaic model of membrane structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838(6): 1451-1466.
- [ 21 ] ZHAO X, WANG Y, LIU JL, *et al.* Fumonisin B1 affects the biophysical properties, migration and cytoskeletal structure of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2020, 78(3): 375-382.
- [ 22 ] ZHENG Q, LONG J, JIA B, *et al.* Transforming growth factor- $\beta$ 1 deteriorates microrheological characteristics and motility of mature dendritic cells in concentration-dependent fashion [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2014, 56(1): 25-40.
- [ 23 ] SCHULZ O, HANČ P, BÖTTCHER JP, *et al.* Myosin II synergizes with F-Actin to promote DNGR-1-dependent cross-presentation of dead cell-associated antigens [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(2): 419-428.
- [ 24 ] BENDELL AC, WILLIAMSON EK, CHEN CS, *et al.* The Arp2/3 complex binding protein HS1 is required for efficient dendritic cell random migration and force generation [J]. *Integr Biol*, 2017, 9(8): 695-708.
- [ 25 ] TONG L, YUE P, YANG Y, *et al.* Motility and mechanical properties of dendritic cells deteriorated by extracellular acidosis [J]. *Inflammation*, 2021, 44(2): 737-745.