

Wu C X, Li Q F, Sui C X, *et al.* Differential cellular responses to ω -3 and ω -6 fatty acids mediated by FFAR4 receptor in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, 49(12): 122505. [吴彩霞, 李庆飞, 隋昌序, 等. 大黄鱼FFAR4受体介导 ω -3与 ω -6脂肪酸对细胞的差异性影响机制 [J]. 水生生物学报, 2025, 49(12): 122505.]

大黄鱼FFAR4受体介导 ω -3与 ω -6脂肪酸对细胞的差异性影响机制

吴彩霞 李庆飞 隋昌序 艾庆辉

(中国海洋大学水产学院, 海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003)

摘要: 本研究旨在揭示大黄鱼(*Larimichthys crocea*) FFAR4对LC-PUFAs, 特别是 ω -3和 ω -6脂肪酸的识别机制及其信号转导特征。本研究构建了稳定表达大黄鱼FFAR4 (LcFFAR4)的HEK293T细胞系, 并在该模型基础上系统开展了配体诱导的受体内化、胞内钙离子流变化及环磷酸腺苷(cAMP)信号通路激活等方面的研究。亚细胞定位结果显示, LcFFAR4主要定位于细胞膜。脂肪酸处理后发现, 二十碳五烯酸(EPA, ω -3)和亚油酸(LA, ω -6)均可诱导LcFFAR4内化, 且EPA的诱导效果显著强于LA。钙流检测结果显示, 低浓度EPA可显著诱导胞内钙离子浓度升高, 提示其可激活钙信号通路, 而LA未引起显著的钙流变化。同时, 双荧光素酶报告实验表明, EPA和LA均可激活LcFFAR4介导的cAMP信号通路, 但EPA激活效应更为显著。进一步的功能探究发现, 相比于LA, EPA通过LcFFAR4缓解LPS诱导的炎症反应效果更显著。以上研究结果表明, LcFFAR4对不同脂肪酸具有明显的配体选择性和信号偏向性。本研究首次从GPCR信号转导的角度揭示了鱼类感知 ω -3和 ω -6脂肪酸的响应差异, 为深入理解鱼类脂肪酸感知系统及其在营养感知与代谢调控中的作用提供了理论依据。

关键词: FFAR4; 长链多不饱和脂肪酸; 内化; 钙信号; cAMP; 配体偏好性; 大黄鱼

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2025)12-122505-09

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0175 **CSTR:** 32229.14.SSSWXB.2025.0175



G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是动物体内一类重要的跨膜信号感受器, 多个研究表明, GPCRs广泛参与脂肪酸引发的细胞信号转导过程^[1, 2]。其中, 游离脂肪酸受体4 (Free Fatty Acid Receptor 4, FFAR4, 亦称GPR120)是近年来被广泛研究的一种能够被中长链不饱和脂肪酸激活的GPCR。在哺乳动物中, FFAR4被证实能够特异识别 ω -3长链脂肪酸(如EPA、DHA), 其激活可调节葡萄糖代谢、抑制炎症并改善胰岛素敏感性^[3-6]。FFAR4的七次跨膜结构组成的配体识别口袋, 能够识别脂肪酸分子的双键位点并与之结合, 从而激活Gaq、Gas等G蛋白, 诱导细胞内Ca²⁺流动、cAMP

生成; 同时也能激活 β -arrestin介导的非经典信号途径^[7-9]。结构生物学研究显示, FFAR4可与多重顺式双键的长链脂肪酸结合, 并主要通过耦合Gq信号通路, 引发胞内Ca²⁺含量上升, 同时也能通过Gs和Gi介导cAMP信号途径^[7]。相比之下, FFAR4对饱和或双键较少的脂肪酸响应水平较弱。

虽然哺乳动物FFAR4的功能特性已被广泛研究, 但在鱼类中, FFAR4受体的表达特征、配体选择性、下游信号转导及生理功能尚缺乏系统研究。近年研究发现, 大黄鱼FFAR4在头肾、脾脏等免疫组织中表达较高, 且能够参与到鱼类免疫调控^[10]。大量研究已表明, 大黄鱼的健康状况和免疫功能在很大程度上受

收稿日期: 2025-04-19; **修订日期:** 2025-06-03

基金项目: 国家自然科学基金(32102807); 山东省自然科学基金(ZR2024MC004); 国家重点研发计划(2023YFD2400601); 国家海水渔业技术体系项目(CARS-47-G10)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (32102807); Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2024MC004); the National Key Research and Development Program of China (2023YFD2400601); the China Agriculture Research System for Marine Fish Culture Industry (CARS-47-G10)]

作者简介: 吴彩霞(2000—), 女, 硕士研究生; 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: cxwu@stu.ouc.edu.cn

通信作者: 艾庆辉, E-mail: qhai@ouc.edu.cn

饲料脂肪酸组成的影响^[11, 12]。随着鱼油资源日益短缺, 植物油富含 ω -6脂肪酸(如亚油酸LA), 而缺乏来源于海洋的 ω -3脂肪酸(如EPA和DHA)。植物油替代鱼油显著降低了饲料及鱼体内 ω -3 LC-PUFAs含量, 提高了 ω -6/ ω -3比例, 这是导致脂质代谢紊乱、慢性炎症倾向及免疫抑制的重要原因之一^[13-15]。由此可见不同类型的LC-PUFA(如 ω -3和 ω -6)能够发挥不同的免疫调控作用。然而, 不同类型LC-PUFA(如 ω -3和 ω -6)是否能够激活FFAR4, 以及FFAR4介导的信号转导途径是否存在差异, 目前尚无相关研究。

为深入揭示鱼类FFAR4对典型 ω -3和 ω -6脂肪酸的识别与功能差异, 本研究构建了稳定表达大黄鱼FFAR4融合蛋白的HEK293T细胞系, 采用共聚焦显微成像、细胞内钙离子示踪和双荧光素酶报告基因实验等方法, 探究了EPA和LA诱导的FFAR4受体内化、胞内 Ca^{2+} 流动和cAMP水平变化。在此基础上, 结合LPS诱导的大黄鱼巨噬细胞炎症模型, 进一步比较了EPA与LA通过FFAR4缓解炎症反应的效应差异。通过多层次对比分析, 旨在阐明FFAR4在感知EPA与LA过程中信号激活特征的差异, 为深入理解鱼类对脂类的营养感知及其在免疫调控中的作用机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

本研究基于NCBI数据库中的大黄鱼FFAR4基因序列(XM_027278515.1)获取了该基因的核酸序列及编码的蛋白序列。为分析FFAR4在不同物种间的序列保守性与进化关系, 进一步通过NCBI数据库检索并下载了多个代表性物种的FFAR4蛋白同源序列, 包括大黄鱼(*Larimichthys crocea*, XP_027134316.1)、人(*Homo sapiens*, KAI4076842.1)、小鼠(*Mus musculus*, NP_861413.1)、鸡(*Gallus gallus*, XP_003641529.3)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, XP_041424676.1)、黄姑鱼(*Nibea albiflora*, KAG8000131.1)、翘嘴鲇(*Siniperca chuatsi*, XP_044069676.1)等物种。随后, 使用MEGA 11软件(version 11.0.13, 美国), 基于Clustal W算法进行多序列比对, 并采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树, 以揭示大黄鱼FFAR4在不同类群中的进化位置及其与其他物种之间的亲缘关系。该系统发育分析涵盖哺乳动物、鸟类、两栖动物及硬骨鱼类, 较全面地反映了FFAR4在脊椎动物中的保守性与分化特征, 为后续功能验证提供理论依据。

1.2 细胞的培养与传代

本实验所用HEK293T细胞来自本实验室细胞

库, 采用高糖型Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, 美国)作为基础培养基, 添加10%胎牛血清(Fetal Bovine Serum, Gibco, 美国)和1%抗生素(青链霉素混合液, 北京索莱宝科技有限公司), 配制成DMEM完全培养基, 用于普通HEK293T细胞的培养。pCDH-LcFFAR4-eGFP-HEK293T细胞与pCDH-eGFP-HEK293T细胞由实验室前期构建, 通过上述基础完全培养基中补加2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素盐酸盐(北京索莱宝科技有限公司), 可筛选稳定表达载体的细胞株。

细胞均以贴壁方式在10 cm细胞培养皿中进行培养, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中恒温恒湿条件下生长。细胞状态良好时, 每天传代1次, 确保细胞生长过程处于对数生长期, 用于后续实验。

1.3 脂肪酸溶液的配制

实验所用脂肪酸包括二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid, EPA, 分子量302.45)和亚油酸(Linoleic acid, LA, 分子量280.45), 均购自Sigma-Aldrich公司(Sigma, 美国)。脂肪酸母液以二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO, 北京索莱宝科技有限公司)为溶剂配制, 具体方法: 称取10 mg EPA溶于330.6 μL DMSO中, 或10 mg LA溶于356.6 μL DMSO中, 经充分涡旋混匀后, 可制得约100 mmol/L的脂肪酸母液。所得母液经0.22 μm 滤膜除菌后分装, 密封后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。实验处理前, 将上述母液按照设定比例加入DMEM基础培养基中稀释至目标浓度。对照组使用含0.1% (v/v) DMSO的DMEM基础培养基, 作为溶剂对照。

1.4 亚细胞定位与受体的内化

本实验使用pCDH-LcFFAR4-eGFP-HEK293T细胞作为观察大黄鱼FFAR4受体内化和亚细胞定位的细胞材料, 同时以pCDH-eGFP-HEK293T细胞作为对照。将细胞接种于含盖玻片的12孔培养板中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养24h, 以确保细胞充分贴壁。在细胞贴壁后, 用无血清的高糖型DMEM培养基处理2h。随后, 加入100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的EPA或LA, 处理30min。最后用预冷的PBS轻柔洗涤3次以去除未结合的脂肪酸。

为了对FFAR4进行亚细胞定位, 首先使用细胞膜红色荧光探针DiI (上海碧云天生物技术有限公司)对细胞膜进行标记。配置2.5%的DiI工作液, 使细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育5min, 吸弃染液, 使用PBS清洗细胞2—3次以去除残余染液。接着, 用4%多聚甲醛固定细胞1min, 随后再次使用PBS清洗。在细胞固定后, 滴加10 μL 含DAPI的抗荧光淬灭封片液(上海碧云天生物技术有限公司)至载玻片上,

然后将盖玻片加在载玻片上,需避免气泡形成。在封片完成后,使用激光共聚焦显微镜(Leica, 德国)进行观察。在405、488和561 nm激发光条件下,通过共聚焦显微镜观察受体亚细胞定位及其内化。

1.5 钙流检测

本研究采用稳定表达大黄鱼FFAR4的HEK 293T细胞(pCDH-LcFFAR4-eGFP-HEK293T)及空载体对照细胞(pCDH-eGFP-HEK293T)作为实验模型,使用钙离子荧光指示探针pGP-CMV-NES-jRGECO1a (Addgene, 美国)检测脂肪酸刺激下胞内钙离子浓度变化。首先将细胞接种于6孔板中并培养至70%—80%融合度后进行荧光探针转染。每孔加入12 ng pGP-CMV-NES-jRGECO1a质粒与36 μ L EZ Trans转染试剂[和元李记(上海)生物技术有限公司],并按照说明书操作进行转染。转染后细胞置于37℃、5% CO₂恒温培养箱中培养24h,以确保荧光探针充分表达。

在转染完成后,细胞经胰酶消化并接种至96孔黑壁透明底板中,每孔100 μ L,继续培养过夜。在检测前,细胞用含钙镁的Hanks平衡盐缓冲液(HBSS)饥饿处理2h,以去除培养基中可能干扰钙信号的成分。随后用HBSS清洗细胞1—2次,最终每孔补加50 μ L HBSS用于检测。

在钙流检测过程中,使用多功能荧光酶标仪(BioTek Synergy, 美国)设定激发波长590 nm,发射波长610 nm,实时采集细胞内荧光强度变化。在实验开始前,先记录30s内的基线荧光值(F_0);随后分别加入不同浓度(0、0.1、1、10、100和200 μ mol/L)的脂肪酸溶液(EPA或LA),连续记录脂肪酸刺激后90s内每秒的荧光信号值(F_t),并以 $\Delta F/F_0$ ($\Delta F = F_t - F_0$)表示细胞内钙离子流的相对变化。

1.6 cAMP检测

本实验采用pCDH-LcFFAR4-eGFP-HEK293T细胞及pCDH-eGFP-HEK293T细胞作为模型,作为实验组与对照组细胞模型,用于评估脂肪酸刺激对胞内cAMP水平的调控效应。细胞接种于24孔板,当融合度达到80%—90%时,采用EZ Trans转染试剂,将cAMP反应元件荧光素酶报告质粒[(pGL4.29 luc2P/CRE/Hygro)]与内参质粒pRL-CMV (Renilla luciferase)共转染至细胞中。每孔转染质粒总量为800 ng,转染试剂3 μ L。空载报告质粒pGL4.10与pRL-CMV共转染组作阴性对照。

在转染后细胞继续培养24h,每1 mL培养基中分别加入1 μ L 10 nmol/L Forskolin及1 μ L 100 mmol/L EPA或100 mmol/L LA共同处理细胞,阴性对照组(pGL)和空白对照组(CON)加入等量Forskolin及

DMSO。在脂肪酸刺激2h后,吸弃培养基,用PBS清洗1遍,随后每孔加入100 μ L 1×裂解液,室温下裂解10min。将裂解液转移至200 μ L PCR管中,1000 ×g离心5min,取上清用于双荧光素酶检测。

cAMP检测采用TransDetect® Double-Luciferase Reporter Assay Kit (北京全式金生物技术有限公司),操作步骤按说明书进行调整。在白色96孔板中,每孔加入10 μ L上清液,依次加入50 μ L LRS 检测荧光素酶(Firefly luciferase)活性,再加入50 μ L LRS II检测海肾荧光素酶(Renilla luciferase)活性。最终通过荧光素酶/海肾荧光素酶比值反映CRE启动子的激活水平,间接评估cAMP信号通路的激活强度。每组设3个重复孔,确保数据的可靠性与统计有效性。

1.7 大黄鱼巨噬细胞培养与处理

大黄鱼巨噬细胞系为本实验室成员所构建并稳定传代^[16]。细胞培养于T75培养瓶中,置于28℃恒温培养箱内,培养基为含10%胎牛血清和1%抗生素的DMEM/F12完全培养基。细胞生长至90%—100%融合度时进行传代培养,传代间隔约为48h。

为探究EPA和LA对过表达FFAR4的大黄鱼巨噬细胞炎症反应的影响,利用携带FFAR4-EGFP-3 × Flag的腺病毒感染大黄鱼巨噬细胞,以携带EGFP的腺病毒作为阴性对照。具体操作步骤:当T75培养瓶中巨噬细胞融合度达90%—100%时,经胰酶消化后以 1.5×10^6 个细胞/孔密度接种于12孔细胞培养板中,28℃培养8—10h至40%—50%贴壁率后,分别加入含FFAR4-EGFP-3×Flag (12 μ L/mL)或EGFP对照 (8 μ L/mL)腺病毒的培养基500 μ L,感染4h,随后补加等体积完全培养基,继续培养至感染总时长为12h。在感染结束后,吸弃含腺病毒的培养基,更换为新鲜培养基,继续培养12h。

采用无血清基础培养基对已稳定表达大黄鱼FFAR4的巨噬细胞进行饥饿处理2h,然后分别加入含50 μ mol/L EPA或50 μ mol/L LA的培养基,孵育8h。之后加入脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS, sigma, 美国),使其终浓度为50 μ g/mL,继续刺激12h。在实验结束后,用预冷PBS清洗细胞3次,分别加入TRIzol裂解液收集样本用于荧光定量PCR实验。

1.8 RNA提取及实时反转录定量PCR

RNA提取实验采用TRIzol法,提取过程在生物安全柜内低温操作^[17, 18]。用Nano Drop® 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国)测定OD值,OD₂₆₀/OD₂₈₀值在1.8—2.0且尽量接近于2.0。采用HiScript® II Q Select RT SuperMix for qPCR试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行反转录合成cDNA,于-20℃保存用于后续qPCR分析。

实时荧光定量反应使用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (南京诺维赞生物科技有限公司)作为荧光试剂,其反应体系为20 μ L,其中cDNA模板2 μ L,上游引物0.5 μ L,下游引物0.5 μ L,荧光反应酶10 μ L,DEPC水7 μ L,混合后体系在实时荧光定量PCR仪(BIO-RAD,美国)进行实时荧光定量聚合酶链反应。反应程序为95 $^{\circ}$ C预变性2min,然后95 $^{\circ}$ C变性10s,58 $^{\circ}$ C退火10s和72 $^{\circ}$ C下延伸20s,39个循环。在循环反应结束后,进行熔解曲线分析,以确定PCR反应产物的特异性。引物信息见表1,分析方法采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析实验结果。

1.9 统计分析

本研究所有数据均采用SPSS 25.0统计软件(IBM,美国)进行处理。多组数据在统计分析前,首先对数据进行正态性检验(Shapiro-Wilk检验)和方差齐性检验(Levene检验)。对于符合正态分布且方差齐性的变量,采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间差异比较,并结合Tukey's多重比较检验,统计学显著性水平设定为 $P<0.05$ 。两组间比较采用独立样本 t 检验。所有结果以平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ standard error, SE)表示。数据可视化通过GraphPad Prism 9软件(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, 美国)完成。

2 结果

2.1 生物信息学分析

多序列比对结果表明,大黄鱼FFAR4受体与其他物种的同源受体之间具有高度的氨基酸序列相似性。尤其是大黄鱼FFAR4与硬骨鱼类中的FFAR4受体(如黄姑鱼*Nibea albiflora*、翘嘴鲌*Siniperca*

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for quantitative Real-time PCR

基因Gene	引物Primer (5'—3')	序列号 Accession number
β -肌动蛋白 <i>β-actin</i>	GCTGTCTTCCCTTCTAT CGTCG TCCATGTCATCCAGTT GGTC	XM_010732326
游离脂肪酸受体4 <i>ffar4</i>	GAGTCAGCCAGCAGTT GAGT ACAAGGACCAGAAGAG TGCG	XM_027278515.1
白细胞介素6 <i>il-6</i>	CGACACACCCACTATTT ACAAC TCCCATTTTCTGAACTG CCTCT	XM_010734753
白细胞介素1 β <i>il-1β</i>	CATAGGGATGGGGACA ACGA AGGGGACGGACACAAG GGTA	XM_010736551.3
肿瘤坏死因子 α <i>tnf-α</i>	ACACCTCTCAGCCACA GGAT CCGTGTCCCACTCCATA GTTC	NM_001303385.1

chuatsi)之间的序列相似性较高(75%以上)。系统发育树分析显示,大黄鱼FFAR4与其他硬骨鱼类FFAR4聚为一支,明显区别于哺乳动物和两栖、鸟类的FFAR4分支,表明鱼类FFAR4在进化上形成独立分支(图1)。大黄鱼FFAR4与斑马鱼等鱼类FFAR4亲缘关系最近,而与哺乳动物(人、小鼠等)的同源受体距离较远,这与物种进化关系一致。

2.2 不同脂肪酸对大黄鱼FFAR4内化的影响

通过荧光蛋白标记的亚细胞定位实验发现,LcFFAR4-eGFP融合蛋白在细胞中高度集中于细胞膜区域,提示FFAR4属于膜蛋白(图2)。在稳定表达LcFFAR4的HEK293T稳转细胞中,0.1% DMSO(作为阴性对照)处理条件下,细胞膜荧光均匀而完整,无明显内化迹象。而经50 μ mol/L的EPA处理30min后,显著观察到细胞膜表面的绿色荧光减弱,同时胞质区出现大量点状荧光聚集,表明FFAR4受体发生大量内化。相比之下,LA处理组也出现一定程度的荧光聚集,但内化效率和胞内聚集强度均明显低于EPA组(图2)。

2.3 大黄鱼FFAR4介导脂肪酸引起胞内钙流变化

为探究LcFFAR4在介导脂肪酸诱导的钙离子内流过程中的作用,将钙离子指示荧光探针pGP-CMV-NES-jRGECO1a瞬时转染到LcFFAR4-eGFP-HEK293T稳转细胞后进行体外检测,并以pCDH-eGFP-HEK293T稳转细胞为阴性对照。结果显示,在pCDH-eGFP-HEK293T细胞中,无论EPA还是LA处理均未观察到细胞内明显的钙离子信号变化(图3A和3C),表明HEK293T细胞中无内源性钙离子信号。对pCDH-LcFFAR4-eGFP-HEK293T细胞而言,EPA处理后检测到胞内钙荧光强度显著升高,其 $\Delta F/F_0$ 在1 μ mol/L浓度达到峰值(图3B)。而LA处理组在整个剂量梯度内仅表现出较为缓和的钙离子信号响应(图3D)。这些结果表明,EPA诱导的细胞内钙流幅度和峰值均高于LA处理组。1 μ mol/L的EPA处理细胞时即可引起钙离子信号变化显著增强,峰值 $\Delta F/F_0$ 远高于相同剂量的LA处理组,进一步证明FFAR4能够更敏感地响应EPA的刺激,引

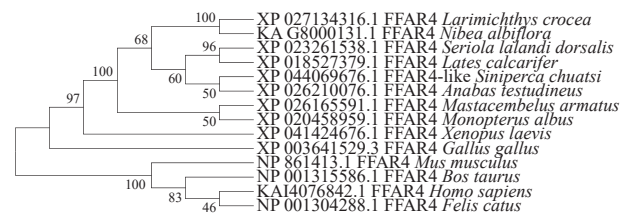


图1 大黄鱼与其他物种FFAR4的系统发育树构建

Fig. 1 Phylogenetic analysis of FFAR4 in large yellow croaker and other species

发更强烈的细胞内钙流反应。

2.4 大黄鱼FFAR4介导脂肪酸对胞内cAMP变化的影响

双荧光素酶报告显示, 在pCDH-eGFP-HEK-293T细胞中, EPA和LA处理对CRE-Luc报告系统的活性无显著影响。而在pCDH-LcFFAR4-eGFP-HEK-293T细胞中, EPA和LA处理均可显著提升CRE-Luc报告系统的活性, 与空白对照组相比其荧光素酶活性显著增加($P<0.05$; 图4)。这表明两种脂肪酸都能通过FFAR4激活Gs介导的cAMP信号通路。需要指出的是, EPA诱导的cAMP响应幅度显著高于LA (图4)。

2.5 大黄鱼FFAR4介导脂肪酸对胞内炎症反应的影响

为探究EPA和LA对大黄鱼FFAR4激活的差异, 本研究在大黄鱼巨噬细胞中通过腺病毒载体构建FFAR4过表达细胞模型, 结果显示, FFAR4过表达组中 $ffar4$ 的mRNA水平较GFP对照组显著升高($P<0.05$; 图5), 表明本研究成功构建过表达FFAR4的大黄鱼巨噬细胞模型。进一步的脂肪酸处理实验发现, 在过表达FFAR4的大黄鱼巨噬细胞中, EPA

和LA均能缓解LPS诱导的 $il-6$, $il-1\beta$ 和 $tnf-\alpha$ 的表达上调, 其中以EPA效果最为显著(图6)。

3 讨论

FFAR4作为长链多不饱和脂肪酸感知受体, 已被证实参与哺乳动物代谢调节、炎症抑制和维持能量稳态等多个生理过程^[3, 19–21]。近年来, 多个鱼类物种的基因组解析中也预测出了FFAR4的同源基因, 提示其在鱼类中可能具有类似的生物学功能^[22–24]。然而, 关于鱼类FFAR4的研究尚处于起步阶段, 特别是不同脂肪酸对其的激活特性、FFAR4的配体选择性及其介导的信号通路尚缺乏明确的实验证据。本研究通过稳定表达大黄鱼FFAR4的HEK293T细胞模型, 首次比较了 ω -3脂肪酸(EPA)与 ω -6脂肪酸(LA)对FFAR4受体的激活差异, 从受体内化、钙离子信号及cAMP通路三个层面系统评估了其信号转导特性, 并对其介导的抗炎作用进行了评估。这一研究不仅补充了鱼类FFAR4功能的实证数据, 也为进一步阐明鱼类感知脂类的营养机制提供了理论支撑。

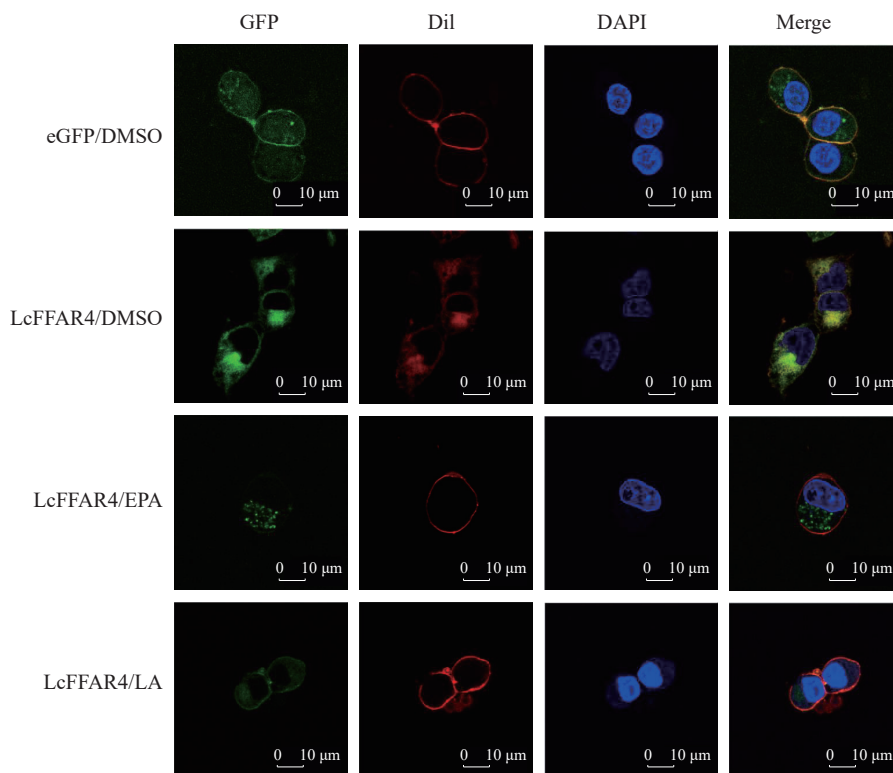


图2 EPA和LA对LcFFAR4内化的影响

Fig. 2 Effects of EPA and LA on LcFFAR4 internalization

eGFP代表pCDH-eGFP-HEK293T细胞; LcFFAR4代表LcFFAR4-eGFP-HEK293T细胞; 实验组为DHA或EPA的处理; DMSO为空白对照; 细胞膜、细胞核分别用Dil和DAPI染色; 使用共聚焦激光显微镜进行可视化; 标尺=10 μ m

eGFP refers to pCDH-eGFP-HEK293T cells, and LcFFAR4 refers to LcFFAR4-eGFP-HEK293T cells; The experimental groups are treated with DHA or EPA, while DMSO is used as the vehicle control; Cell membranes and nuclei are stained with Dil and DAPI, respectively; Visualization is performed using confocal laser scanning microscopy; Scale bar=10 μ m

3.1 EPA与LA对大黄鱼FFAR4受体内化的影响

在哺乳动物中, LC-PUFAs作为FFAR4的天然激动剂, 能引起FFAR4构象变化并介导下游信号转导^[3, 25]。然而, 鱼类FFAR4是否对LC-PUFAs具备相同的识别与响应机制尚未完全明确。Oh等^[6]在哺乳动物细胞中报道, EPA可激活FFAR4, 并通过 β -arrestin2介导其内化过程。同样, 在本研究中, 我们观察到LcFFAR4主要定位于细胞膜表面, 并在脂肪酸刺激下发生典型的内化现象, 形成胞质内荧光聚集体, 类似的配体依赖性受体内化差异在其他GPCR中也有报道, 即高效完全激动剂往往诱导更明显的受体内吞^[26]。值得注意的是EPA可在较短时间内显著诱导FFAR4从细胞膜内化, 形成胞质内荧光聚集体, 证明其具有较强的FFAR4激活功能。相比之

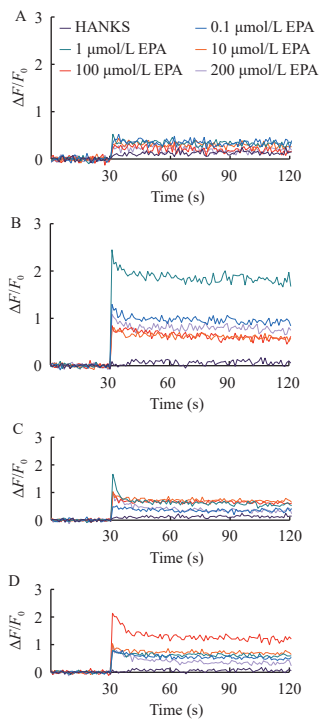


图3 EPA和LA对LcFFAR4-HEK293稳转细胞钙流变化的影响
Fig. 3 Effects of EPA and LA on changes of intracellular calcium flux in LcFFAR4-HEK293 cells

A—B. EPA处理对pCDH-eGFP-HEK293T细胞(A)和pCDH-LcFFAR4-eGFP-HEK293T细胞(B)胞内钙流的影响; C—D. LA处理对pCDH-eGFP-HEK293T细胞(C)和pCDH-LcFFAR4-eGFP-HEK293T细胞(D)胞内钙流的影响; 钙离子流的变化通过多功能酶标仪进行检测, 结果为3次独立实验的数据

A—B. Effects of EPA treatment on intracellular calcium flux in pCDH-eGFP-HEK293T cells (A) and pCDH-LcFFAR4-eGFP-HEK293T cells (B). C—D. Influence of LA treatment on intracellular calcium flux in pCDH-eGFP-HEK293T cells (C) and pCDH-LcFFAR4-eGFP-HEK293T cells (D); Calcium flux is measured using a multifunctional microplate reader. Data represent representative results from three independent experiments

下, LA处理后内化现象较弱, 说明其FFAR4激活功能较弱。以上结果表明鱼类FFAR4同样具备典型的激活-内化反应模式, 且其对配体的偏好性具有高度保守性。

3.2 EPA与LA对大黄鱼FFAR4介导的第二信使信号转导的影响

GPCR受体激活常伴随着细胞内第二信使的变化, 钙离子作为经典的第二信使之一, 长期以来被认为在细胞功能调节中发挥核心作用^[8, 27]。在本研究中, EPA在1 μ mol/L浓度下即能显著激发胞内 Ca^{2+} 流动, 而LA在相同浓度及更高剂量下均未能产生明显钙响应。这表明EPA通过FFAR4高效耦合Gq信号, 调动胞内钙储备, 而LA在钙通路上激动能力有限。该现象与Lingblom等^[24]研究人源FFAR4在嗜酸性粒细胞中介导的钙信号机制相吻合。除钙离子外, cAMP作为最早被发现的第二信使, 在GPCR

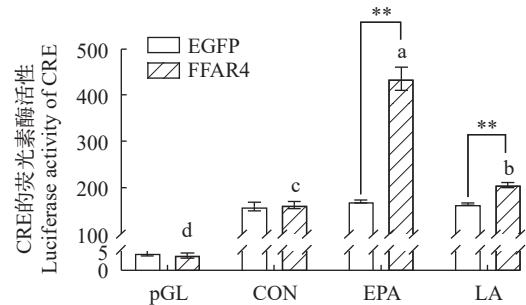


图4 EPA和LA对表达FFAR4和EGFP的稳转HEK293T细胞CRE荧光素酶报告基因活性的影响

Fig. 4 Effect of EPA and LA on CRE luciferase intensity in HEK293T stably expressing LcFFAR4

数据以平均值 $\pm$ 标准误表示(mean $\pm$ SE, $n=3$); 柱状图上不同的上标字母表示组内不同处理组间数据有显著性差异($P<0.05$), **表示组间数据差异极显著($P<0.01$); 下同

Data are expressed as mean $\pm$ SE, $n=3$; Different superscript letters above bars indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$), ** indicates highly significant difference within the same FA treatment ($P<0.01$); The same applies below

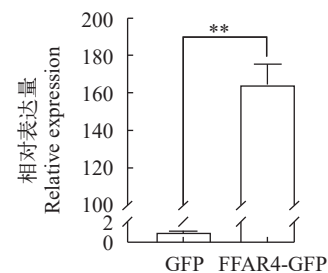


图5 腺病毒感染大黄鱼巨噬细胞后细胞内 $ffar4$ 基因的表达水平

Fig. 5 Expression level of $ffar4$ in macrophages of large yellow croaker following adenovirus infection

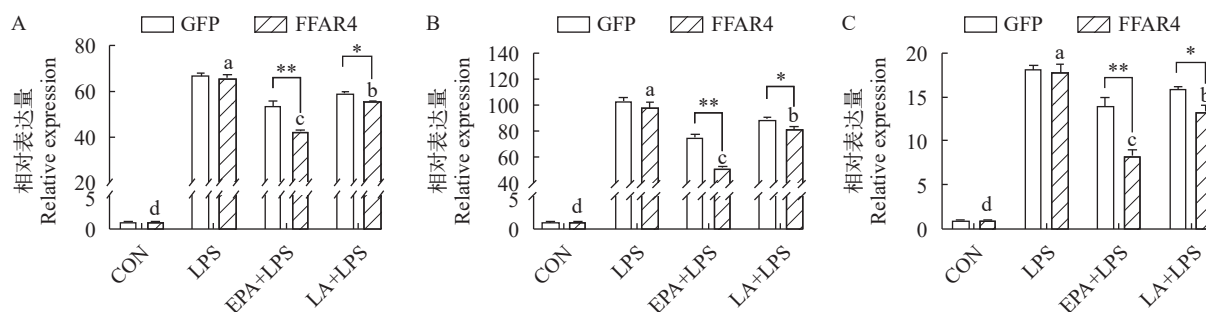


图6 EPA和LA通过FFAR4调控炎症因子基因表达的影响

Fig. 6 Effects of EPA and LA on the expression of inflammatory cytokine genes of large yellow croaker macrophages overexpressing FFAR4 or EGFP

EPA和LA处理对过表达GFP或FFAR4-GFP的大黄鱼巨噬细胞中炎症因子基因*il-6* (A)、*il-1β* (B)和*tnf-α* (C) mRNA表达的影响
Effects of EPA and LA treatment on mRNA expression levels of inflammatory cytokines *il-6* (A), *il-1β* (B), and *tnf-α* (C) in large croaker macrophages overexpressing GFP or FFAR4-GFP

介导的信号转导中同样发挥重要作用^[28–31]。在通常情况下, FFAR4主要通过Gq途径作用于细胞, 但近期有研究指出FFAR4在不同配体作用下可发生偏向性信号传导, 例如某些配体能够诱导FFAR4偶联Gs并引发cAMP升高^[7, 8, 32]。在本研究中, EPA处理组细胞内cAMP水平高于LA处理组, 暗示相比于LA, EPA引发了更显著的Gs偶联效应。以上表明, FFAR4可激活Gq与Gs双重信号通路, 这与Kimura等^[3]的报道一致。本研究明确了鱼类FFAR4具有级联并激活细胞内多条路径的能力, 也提示脂肪酸类型不仅决定其激活强度, 还可能影响其信号偏向。

3.3 EPA与LA在大黄鱼FFAR4介导的抗炎反应中的作用差异

大量研究已表明FFAR4在调节哺乳动物的炎症反应中具有重要作用^[33, 34]。本研究发现, EPA和LA均能缓解LPS诱导的炎症反应。这与小鼠的研究相似, 脂肪酸激活FFAR4后能缓解炎症反应^[35]。然而, 在过表达FFAR4的大黄鱼巨噬细胞中, DHA和LA对LPS诱导的*il-6*、*il-1β*和*tnf-α*表达上调的抑制作用不同, 相比于LA组, EPA组的抗炎效果较强, 这与哺乳动物研究中 ω -3脂肪酸具有更强抗炎活性的结论一致^[36]。EPA和LA在免疫调控效果上的差别可能与配体特异的信号偏向性有关。值得注意的是, 与LA相比, EPA对FFAR4具有更强的激活作用, 这可能与其分子结构中更多的顺式双键有关, 从而使其更易与FFAR4受体结合并稳定激活构象。然而, 上述推论主要基于EPA和LA这两种代表性脂肪酸, FFAR4对不同脂肪酸的不同比较还应在未来通过更多脂肪酸配体种类的实验加以验证。

4 结论

本研究表明, 大黄鱼FFAR4受体在响应不同脂

肪酸刺激时表现出显著的功能差异。与 ω -6脂肪酸LA相比, ω -3脂肪酸EPA在诱导FFAR4内化、激活钙信号及启动抗炎通路方面更为有效, 进而更显著地抑制炎症因子的表达, 揭示了其在营养免疫调控中的重要作用。本研究初步阐明了FFAR4对不同不饱和脂肪酸的差异性响应, 但其结构机制尚待深入。未来应通过结构解析探索其配体选择性与信号偏向性, 并评估饲料脂肪酸组成对鱼类免疫功能的长期影响, 以丰富FFAR4在鱼类免疫营养调控中的研究基础。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Wang J, Xu F, Yang K. Research progress in G protein coupled receptors [J]. *Journal of Southwest Minzu University* (Natural Science Edition), 2020, **46**(6): 563-570. [王靖, 徐芳, 杨孔. G蛋白偶联受体研究进展 [J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2020, **46**(6): 563-570.]
- [2] Tian M, Wu Z, Heng J, *et al.* Novel advances in understanding fatty acid-binding G protein-coupled receptors and their roles in controlling energy balance [J]. *Nutrition Reviews*, 2022, **80**(2): 187-199.
- [3] Kimura I, Ichimura A, Ohue-Kitano R, *et al.* Free fatty acid receptors in health and disease [J]. *Physiological Reviews*, 2020, **100**(1): 171-210.
- [4] Duah M, Zhang K, Liang Y, *et al.* Immune regulation of poly unsaturated fatty acids and free fatty acid receptor 4 [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2023(112): 109222.
- [5] Ichimura A, Hasegawa S, Kasubuchi M, *et al.* Free fatty acid receptors as therapeutic targets for the treatment of diabetes [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2014(5): 236.
- [6] Oh D Y, Talukdar S, Bae E J, *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects [J]. *Cell*, 2010, **142**(5):

- 687-698.
- [7] Yin H, Inoue A, Ma Z, *et al.* Structural basis of omega-3 fatty acid receptor FFAR4 activation and G protein coupling selectivity [J]. *Cell Research*, 2023, **33**(8): 644-647.
- [8] Eichel K, von Zastrow M. Subcellular organization of GPCR signaling [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2018, **39**(2): 200-208.
- [9] Flores-Espinoza E, Thomsen A R B. Beneath the surface: endosomal GPCR signaling [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2024, **49**(6): 520-531.
- [10] Wu M, Li Q, Mai K, *et al.* Regulation of free fatty acid receptor 4 on inflammatory gene induced by LPS in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021(12): 703914.
- [11] Liu Y, Yao C, Cui K, *et al.* Nutritional programming of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae by dietary vegetable oil: effects on growth performance, lipid metabolism and antioxidant capacity [J]. *The British Journal of Nutrition*, 2022(11): 1-14.
- [12] Tan P, Dong X, Mai K, *et al.* Vegetable oil induced inflammatory response by altering TLR-NF- κ B signalling, macrophages infiltration and polarization in adipose tissue of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(59): 398-405.
- [13] Xu D, Xiang X, Li X, *et al.* Effects of dietary vegetable oils replacing fish oil on fatty acid composition, lipid metabolism and inflammatory response in adipose tissue of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2022, **10**(11): 1760.
- [14] Nguyen T M, Mandiki S N M, Salomon J M A J, *et al.* Pro- and anti-inflammatory responses of common carp *Cyprinus carpio* head kidney leukocytes to *E. coli* LPS as modified by different dietary plant oils [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021(114): 103828.
- [15] Tocher D R, Betancor M B, Sprague M, *et al.* Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA: bridging the gap between supply and demand [J]. *Nutrients*, 2019, **11**(1): 89.
- [16] Cui K, Li Q, Xu D, *et al.* Establishment and characterization of two head kidney macrophage cell lines from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020(102): 103477.
- [17] Chen F, Hao T, Chen Q, *et al.* FABP1 induces lipogenesis by regulating the processing of SREBP1 in hepatocytes of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *The FASEB Journal*, 2024, **38**(18): e70036.
- [18] Hao T, Zhang X, Liu Q, *et al.* Phosphatidylethanolamine exerts anti-inflammatory action by regulating mitochondrial function in macrophages of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. *The FASEB Journal*, 2024, **38**(22): e70180.
- [19] Hilgendorf K I, Johnson C T, Mezger A, *et al.* Omega-3 fatty acids activate ciliary FFAR4 to control adipogenesis [J]. *Cell*, 2019, **179**(6): 1289-1305. e21.
- [20] Zhang N, Harsch B, Zhang M J, *et al.* FFAR4 regulates cardiac oxylipin balance to promote inflammation resolution in HFpEF secondary to metabolic syndrome [J]. *Journal of Lipid Research*, 2023, **64**(6): 100374.
- [21] Zhang T, Wang W, Li J, *et al.* Free fatty acid receptor 4 modulates dietary sugar preference via the gut microbiota [J]. *Nature Microbiology*, 2025, **10**(2): 348-361.
- [22] Roy J, Baranek E, Marandel L. Characterization of free fatty acid receptor family in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): towards a better understanding of their involvement in fatty acid signalisation [J]. *BMC Genomics*, 2023, **24**(1): 130.
- [23] Dong Y, Xie Z, You C, *et al.* GPR120-ERK1-Srebp1c signaling pathway regulates long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis in marine teleost *Siganus canaliculatus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2023(264): 110815.
- [24] Lingblom C, Redvall E, Andersson K, *et al.* Polyunsaturated fatty acids in cod evoke chemotaxis and mobilize intracellular calcium in human eosinophils in part via FFAR4 [J]. *Allergy*, 2020, **75**(1): 195-197.
- [25] Hara T, Hirasawa A, Sun Q, *et al.* Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40 [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2009, **380**(3): 247-255.
- [26] Wang T, Cao Z, Shen Z, *et al.* Existence and functions of a kisspeptin neuropeptide signaling system in a non-chordate deuterostome species [J]. *eLife*, 2020(9): e53370.
- [27] Kutsukake M, Kuwabara N, Miyate Y, *et al.* Relationship between Ca^{2+} and cAMP as second messengers in ACTH-induced Cortisol production in bovine adrenal fasciculata cells [J]. *Endocrine Journal*, 2023, **70**(12): 1123-1130.
- [28] Arena D T, Hofer A M. Imaging the cAMP signaling microdomain of the primary Cilium using targeted FRET-based biosensors [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022(2483): 77-92.
- [29] Gerlo S, Kooijman R, Beck I M, *et al.* Cyclic AMP: a selective modulator of NF- κ B action [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, **68**(23): 3823-3841.
- [30] Lezoualc'h F, Fazal L, Laudette M, *et al.* Cyclic AMP sensor EPAC proteins and their role in cardiovascular function and disease [J]. *Circulation Research*, 2016, **118**(5): 881-897.
- [31] Qi L, Friml J. Tale of cAMP as a second messenger in auxin signaling and beyond [J]. *New Phytologist*, 2023, **240**(2): 489-495.
- [32] Mao C, Xiao P, Tao X N, *et al.* Unsaturated bond recognition leads to biased signal in a fatty acid receptor [J].

- Science*, 2023, **380**(6640): eadd6220.
- [33] Zhao Y Y, Liang X Y, Li X, *et al.* Research progress of free fatty acid receptor 4 (FFAR4/GPR120) regulating macrophage function [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2018, **34**(6): 565-570. [赵妍妍, 梁向艳, 李晓, 等. 游离脂肪酸受体4(FFAR4/GPR120)调控巨噬细胞功能的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, **34**(6): 565-570.]
- [34] Ma J, Kitaura H, Ogawa S, *et al.* Docosahexaenoic acid inhibits TNF- α -induced osteoclast formation and orthodontic tooth movement through GPR120 [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023(13): 929690.
- [35] Yang X, Li X, Hu M, *et al.* EPA and DHA differentially improve insulin resistance by reducing adipose tissue inflammation-targeting GPR120/PPAR γ pathway [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2024(130): 109648.
- [36] Oh D Y, Walenta E. Omega-3 fatty acids and FFAR4 [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014(5): 115.

DIFFERENTIAL CELLULAR RESPONSES TO ω -3 AND ω -6 FATTY ACIDS MEDIATED BY FFAR4 RECEPTOR IN LARGE YELLOW CROAKER (*LARIMICHTHYS CROCEA*)

WU Cai-Xia, LI Qing-Fei, SUI Chang-Xu and AI Qing-Hui

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Free fatty acid receptor 4 (FFAR4), a G protein-coupled receptor (GPCR), plays a key role in sensing long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) in mammals. However, its ligand selectivity and downstream signaling mechanisms in fish remain poorly understood. In this study, we investigated the ligand recognition and signaling characteristics of FFAR4 from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), with particular emphasis on ω -3 and ω -6 fatty acids. A stable HEK293T cell line expressing LcFFAR4 was established to systematically assess ligand-induced receptor internalization, intracellular calcium flux, and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway. Subcellular localization analysis revealed predominant plasma membrane distribution of LcFFAR4. Ligand stimulation assays demonstrated that both eicosapentaenoic acid (EPA, ω -3) and linoleic acid (LA, ω -6) induced receptor internalization, with EPA showing significantly stronger effect. Calcium imaging revealed low concentrations EPA markedly increased intracellular calcium levels, indicating activation of the calcium signaling pathway, whereas LA elicited no significant change. Dual-luciferase reporter assays further confirmed both EPA and LA activated the LcFFAR4-mediated cAMP signaling pathway, with EPA displaying a more potent effect. Functional analyses revealed that EPA more effectively mitigated lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses via LcFFAR4. These results collectively demonstrate that LcFFAR4 exhibits distinct ligand selectivity and signaling bias. EPA, an ω -3 fatty acid, functions as a more potent agonist than LA, inducing stronger receptor internalization and more robust activation of both calcium and cAMP signaling pathways. This study provides the first evidence of teleost FFAR4 differential responses to ω -3 and ω -6 fatty acids from a GPCR signaling perspective, offering new insights into the fatty acid sensing mechanisms and their potential roles in nutrient sensing and metabolic regulation in fish.

Key words: FFAR4; Long-chain polyunsaturated fatty acids; Receptor internalization; Calcium signaling; cAMP; Ligand selectivity; *Larimichthys crocea*