二十二碳六烯酸改变脂筏脂肪环境调节白细胞介素 2 受体信号通路*

李秋荣[①] 马 健[①] 谭 力[①] 王 畅[②] 李 宁[①] 李幼生[①]
许国旺[②] 黎介寿[①**]

(① 南京军区南京总医院 解放军普通外科研究所, 南京 210002; ② 中国科学院物理化学研究所 国家色谱分析研究中心, 大连 116011)

摘要 多不饱和脂肪酸(PUFAs)是免疫营养物质, 可以调节机体的免疫反应, 因此, 在临床上PUFAs常被用做免疫抑制剂治疗各种炎性疾病, 但其分子机制尚不清楚. 我们通过蔗糖密度梯度超速离心法分离细胞膜重要的功能性微区域——脂筏, 研究二十二碳六烯酸 (DHA, 22:6 *n*-3) 对其脂肪酸组成和磷脂构成的影响, 以及对 IL-2 受体信号通路的作用. 结果表明, DHA 使脂筏中部分 IL-2Rα, IL-2Rβ和 IL-2Rγ_c 蛋白移位到可溶膜组分中; DHA 抑制了 Jak1, Jak3, 磷酸酪氨酸蛋白表达水平; 脂筏的 STAT5a 和 STAT5b 蛋白移位到可溶膜组分, 磷酸化 STAT5 的表达受到抑制. DHA 使脂筏中多不饱和脂肪酸组分增加, 尤其是增加了 *n*-3 PUFAs 的含量, 改变了细胞脂筏的脂肪环境. 脂筏中饱和脂肪酸豆蔻酸、棕榈酸水平显著升高, 而硬脂酸、油酸、顺式油酸水平显著降低; 磷脂酰胆碱、鞘磷脂、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇分子中脂肪酰取代基团在 DHA 处理之后都有不同程度的改变. 由此可见, DHA 处理改变了脂筏的脂肪环境, 影响了 IL-2 受体信号传导通路蛋白在膜亚区域的分布, 为了解其免疫调节作用的影响提供了部分依据.

关键词 多不饱和脂肪酸 二十二碳六烯酸 脂筏 **IL-2** 受体

多不饱和脂肪酸(PUFAs)调节机体的免疫反应, 特别是T细胞的功能[1], 因此, 在临床上常被用做免疫抑制剂治疗各种炎性疾病. 存在于细胞膜上的PUFAs能够改变膜的流动性, 调节膜上各种受体和酶的功能, 调节细胞膜磷脂的功能, 从而影响T细胞的功能[2,3], 但是, 其作用的分子机制尚不清楚.

脂筏(lipid rafts)为细胞膜液体脂双层内的功能性区域, 富含糖脂、鞘磷脂和胆固醇. 因脂筏不溶于非

2005-01-13 收稿, 2005-07-10 收修改稿
* 国家重点基础研究发展规划项目(批准号: 2003CB515502)、江苏省自然科学基金面上项目(BK2005085)和南京军区南京总医院科研基金(批准号: 2005034)资助
** 联系人, E-mail: liqiurong@yahoo.com

离子活性剂, 利用该化学特征可进行细胞膜亚区域的分离. 现已明确脂筏在一些细胞信号传导中的作用, 许多重要受体和细胞信号传导蛋白都集中在脂筏, 这种受体信号分子的区室化在功能上有重要的意义. 近期研究结果表明, 许多信号传导途径的重要分子, 如T细胞受体(TCR/CD3)、B细胞受体(BCR)、IgE受体存在于脂筏区域中[4,5]. T细胞受体介导的信号传导分子如Src激酶家族[5~7]、G蛋白家族[8]和eNOS蛋白[9]等作为其组成或诱导型成分位于脂筏中, 在该微区域中完成信号传导过程. 多不饱和脂肪酸有可能通过改变脂筏脂肪环境, 使受体蛋白从rafts移位到非功能区域, 产生免疫抑制作用[10].

IL-2 受体亚基复合物(α, β和γ_c)是T细胞增殖和激活诱导细胞死亡(AICD)的重要信号分子. IL-2 和IL-2 受体(IL-2 receptor, IL-2R)结合可以激活下游的Jak激酶家族, 使其磷酸化发挥作用[11]. Jak的磷酸化激活下游的核因子STAT活性, 使其进入核内转录激活[12]. 目前关于脂肪微区域与细胞因子受体的研究很少报道. 关于PUFAs对脂筏中IL-2 受体信号传导的作用尚不清楚.

在以前的研究结果中, 我们已经确定脂筏为IL-2R的功能性微区域, 同时发现二十碳五烯酸EPA(20:5 *n*-3)可以影响T细胞膜脂筏区域中IL-2R三个亚基的分布, 抑制IL-2R的信号传导[13]. 本试验中, 我们对另外一种重要的PUFAs——二十二碳六烯酸(DHA, 22:6 *n*-3)进行了研究, 发现DHA同样可以改变脂筏的脂肪酸组成成分, 且使磷脂分子构成中多不饱和脂肪酸成分显著增加. DHA对膜功能性微区域脂肪酸环境的改变, 影响了IL-2 诱导的JAK-STAT信号通路关键分子在膜不同亚区域的分布, 使部分重要分子从功能性脂肪微区域移位到非功能可溶膜区域, 从而影响了IL-2 的信号传导功能. 这些结果揭示了PUFAs对免疫抑制作用的影响.

1 材料和方法

1.1 实验材料

顺式-4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸(22:6 *n*-3)和硬脂酸(18:0)购于 Sigma-Aldrich 公司(St, Louis, MO). RPMI 1640 培养基、新生牛血清、无血清 IMDM 培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)来源于 Invitrogen 公司(Grand Island, NY). 人类白介素-2(hIL-2)、牛血清白蛋白(组分Ⅴ), 蛋白酶抑制剂 cocktail 和 BM 化学发光 Western blotting kit 购于 Roche 公司(Indianapolis, IN). 用于 Western bloting 山羊抗人 IL-2Rα, IL-2Rβ和 IL-2Rγ_c抗体为 R&D 公司(Minneapolis, MN)产品. 兔抗人 Jak1, Jak3, STAT5a, STAT5b, 磷酸酪氨酸, 酪氨酸磷酸化 STAT5 的抗体均购自 Upstate 公司(Lake Placid, NY). Caveo- lin-1 抗体购于 BD Transduction Laboratories (Lexington, KY). 兔抗山羊 IgG(H&L)辣根过氧化物酶偶联抗体源于 Chemicon International 公司(Temecula, CA). 抗兔辣根过氧化物酶偶联抗体购自 Roche 公司(Indianapolis, IN). Immunotech Coulter 公司的 PC5 标记鼠抗人 CD25(IL-2Rα)mAbs 和阴性 IgG1 抗体用于流式分析.

1.2 细胞培养和脂肪酸处理

人类Jurkat E6-1 T细胞(American Type Culture Collection, Bethesda, MD)用RPMI 1640 培养基, 添加10%热灭活新生牛血清(杭州四季青)和青链霉素(分别为 100 U/mL和 100 μg/mL, Roche), 置于二氧化碳培养箱中, 在 5 % CO_2 于 37℃条件下培养. 为调节细胞的脂肪, 细胞在无血清含 0.4% (*w*/*v*)牛血清白蛋白(fraction V)IMDM培养基培养, 分别用 50 μmol/L硬脂酸(不影响细胞PUFAs成分, 作为对照组[14])或DHA(终浓度≤0.5%乙醇)处理细胞. 细胞进行流式分析或细胞破裂前用 400 U/mL IL-2 刺激 30 min.

1.3 脂筏的分离

脂筏的分离参考文献[5]方法, 采用不连续蔗糖密度梯度超速离心法. 2×10^7 个/mL Jurkat T细胞用Hanks平衡盐溶液(HBSS)清洗后, 用含 1% Brij58 的TKM缓冲液(50 mmol/L Tris, pH 7.4, 25 mmol/L KCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L EDTA), 并加入蛋白酶抑制剂cocktail (含 0.12 mg antipain-HCl, 20 μg bestatin, 40 μg chymostatin, 0.12 mg E-64, 20 μg leupeptin, 20 μg pepstatin, 0.12 mg phosphoramidon, 0.8 mg pefa-bloc, 40 μg aprotinin), 冰上孵育 30 min, 破裂细胞.

与等容量的溶解于TKM缓冲液的 80%(*w*/*v*)蔗糖混合, 5.5 mL 36%蔗糖缓慢覆盖其上层, 然后再用 2.5 mL 5%蔗糖覆盖在顶层, 250000×*g*于 4℃下超速离心(Optima L-80 XP ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA), 离心 18 h. 从顶部每次取 1 mL, 收集不同的分离组分, –80℃保存.

1.4　流式细胞分析

流式细胞仪检测 T 细胞表面 CD25(IL-2α受体)的表达: 用抗 CD25 Cy5 荧光标记及阴性对照的单克隆抗体, 流式细胞仪检测. 收集待测的 Jurkat T 细胞, 调整细胞浓度至 10^6 个/mL, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2)清洗细胞, 每个样本取 50 μL 加入测量管中悬浮细胞, 然后加入 5 μL Cy5 标记的抗 IL-2Rα(CD25)抗体, 另取同样样本加入鼠 IgG_1-Cy5 抗体作为阴性对照. 避光室温放置 30 min, 用 PBS 清洗细胞后, 0.5 mL PBS 悬浮细胞, FACS Calibur 流式细胞仪(Becton Dickinson)检测. CELLQuest 软件分析阳性标记细胞百分率.

1.5　蛋白免疫印记分析

用 10% SDS-PAGE 分离(Bio-Rad, minigel 装置)T 细胞膜亚区域中的蛋白质, 电转运蛋白到 PVDF 膜, 分别用 IL-2Rα, IL-2Rβ和 IL-2Rγ_c抗体以及 Jak1, Jak3, STAT5a, STAT5b 和磷酸酪氨酸(phosphotyrosine)抗体, 二抗为辣根过氧化物酶偶联的 IgG(H&L)抗体, Western bloting 分析, BM 化学发光 Western bloting 检测盒检测, 感光胶片(KODAK BioMAX XAR)曝光 1 min.

1.6　气相色谱分析细胞膜亚区域中脂肪酸组成

取分离的细胞脂筏组分和可溶膜组分, 冻干后加入 1 mL 甲醇(含 0.9%苯骈三氮唑抗氧剂)混匀后, 加入 4 mL 氯仿, 混匀, 再加入 1 mL 的甲醇使氯仿和甲醇的最终体积比为 2∶1, 混悬后, 加入 1 mL 50 mmol/L KCl, 混匀后 2000×*g* 下离心 15 min. 收集有机相, 水相用 1.5 mL 氯仿洗涤 2 次, 转移有机相, 合并 3 次的有机相, 通过有机膜过滤, 38℃旋转蒸干.

在样品中加入 10 μg 正十七碳酸内标和 1 mL 三氯化硼—乙醚∶甲醇溶液(1∶3, *v*/*v*). 置于 75℃水浴 30 min, 冷却, 再加入 0.5 mL 水和 1.5 mL 正己烷, 震荡混匀后, 2000×g 离心 15 min. 收集上清液, 氮气吹干, 溶解于 25 μL 氯仿中, 2 μL 进样. 使用 HP4890 气相色谱仪(Agilent Technologies, Palo Alto, CA), 该系统配备火焰离子化检测器(FID), HP3398A 色谱工作站和 HP-FFAP 石英毛细管色谱柱(30 m 长, 内径 0.32 mm, 涂层厚度为 0.25 μm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). 载气为高纯氮气, 进样器温度是 250℃, 检测器温度为 300℃, 柱头压为 68 kPa, 程序升温: 起始温度 110℃, 以 8℃/min 升温至 180℃, 保持 10 min, 再以 6℃/min 升温至 230℃, 保持 8 min 后, 10℃/min 升温至 250℃, 保持 3 min. 常规比色法测定磷的含量.

1.7　液相色谱质谱联用测定脂筏磷脂脂肪酸构成

取分离的细胞脂筏组分和可溶膜组分, 加入一定量的内标 1, 2-二甘油脂-3-磷脂酰胆碱(DMPC)和 1, 2-二甘油脂-3-磷脂酰乙醇胺(DMPE), 然后加入 1 mL 甲醇(含 0.9%苯骈三氮唑抗氧剂)混匀后, 加入 4 mL 氯仿, 混匀, 再加入 1 mL 的甲醇使氯仿和甲醇的最终体积比为 2∶1, 混悬后, 加入 1 mL 50 mmol/L KCl, 混匀后 2000×g 下离心 15 min. 收集有机相, 水相用 1.5 mL 氯仿洗涤 2 次, 转移有机相, 合并 3 次的有机相, 通过有机膜过滤, 38℃旋转蒸干.

我们使用 QTRAP LC/MS/MS 系统(Applied Biosystems/MDS Sciex)进行质谱检测. 液相色谱为美国安捷伦公司 HP1100 HPLC 仪, 色谱柱(Nucleosil, 100-5 OH, Germany, 250 mm × 3.9 mm i.d. × 5.0 μm), 流速为 0.4 mL/min, 柱温 35℃. 流动相 A 为正己烷/异丙醇/甲酸/氨水(79/20/0.6/0.07, *v*/*v*); 流动相 B 为异丙醇/水/甲酸/氨水(88/10/0.6/0.07, *v*/*v*); 梯度洗脱. 离子源条件为: ESI 喷雾电压为 4.5 kV, 毛细管温度为 250℃.

2　实验结果

2.1　DHA 抑制 T 细胞表面 CD25 的表达

为了检测 DHA 对 T 细胞膜脂筏中 IL-2R 的表达, 我们首先通过流式细胞技术检测了 DHA 处理对细胞

表面 CD25 (IL-2R)表达的影响. 发现有 79.19%的硬脂酸处理组细胞表现 CD25 阳性, 25, 50, 75 μmol/L DHA 处理 Jurkat T 细胞后, CD25 的阳性率分别为 74.05, 59.75, 10.98%(图 1), DHA 抑制 T 细胞表面 CD25 的表达.

2.2 DHA 处理致使脂筏 IL-2R 的亚基移位

最新研究表明, EPA可以改变脂筏的结构和组成, 使脂筏Src激酶 Fyn和Lck移位, 从而抑制T细胞信号传导[15]. 我们研究了IL-2R是否存在于膜脂肪酸微区域中, 观察DHA对脂筏中IL-2R功能的影响. 分析结果表明, 脂筏特征性蛋白caveolin-1, IL-2Rα, IL-2Rβ和IL-2Rγ_c存在于脂筏组分中, 在可溶膜组分中没有检测到caveolin-1, IL-2Rα, IL-2Rβ和IL-2Rγ_c蛋白(图2). DHA处理后, 不仅在脂筏组分中检测到IL-2Rα, IL-2Rβ和IL-2Rγ_c, 而且在可溶膜组分中也检测到(图2), 表明DHA引起部分IL-2R从脂筏中移位到可溶膜组分. DHA处理影响脂筏脂肪微环境, 改变IL-2Rα, IL-2Rβ和IL-2Rγ_c在膜功能性亚区域的分布, 从而影响了IL-2R信号传导.

2.3 Jak1, Jak3 和酪氨酸磷酸化酶在可溶膜组分的表达

IL-2 刺激诱导 Jak1 和 Jak3 的酪氨酸磷酸化, 是 IL-2R 信号传导的关键步骤. 我们仅在可溶膜组分中检测到 Jak1, Jak3 和酪氨酸磷酸(图 3), DHA 处理后, 抑制了 Jak1, Jak3 和酪氨酸磷酸在可溶膜组分表达(图 3).

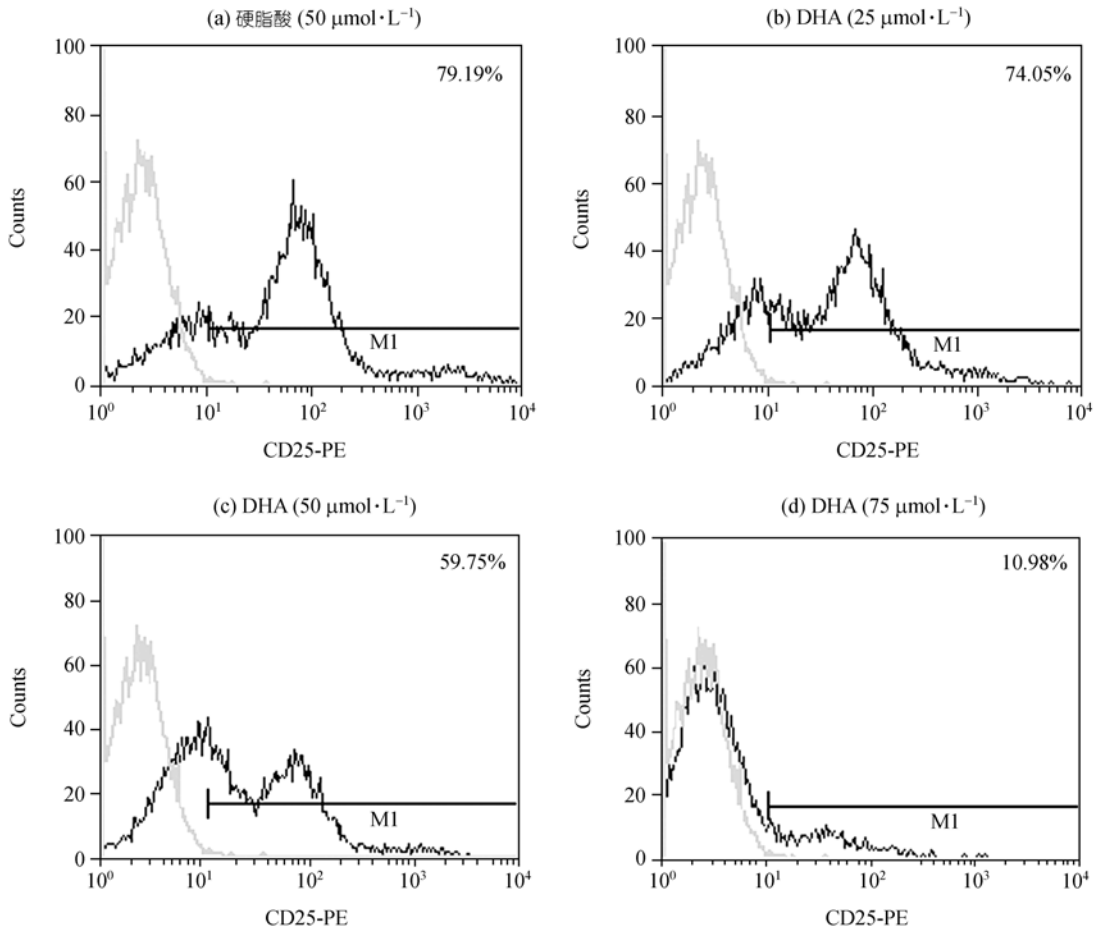

图 1 流式细胞仪检测 DHA 作用 T 细胞后细胞表面 CD25 的表达情况

对照(硬脂酸)和 DHA 处理细胞分别用不同浓度(25, 50, 75 μmol/L)作用 48 h 后, 用荧光标记的抗 CD25 抗体检测

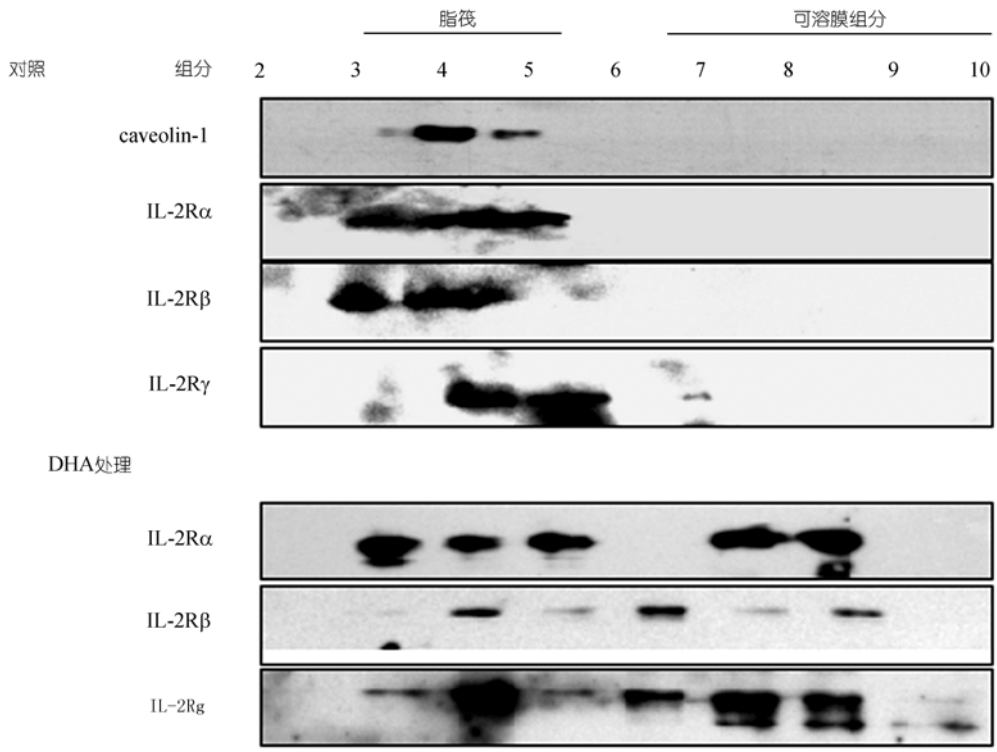

图 2　DHA 作用对 T 细胞膜不同组分中 IL-2Rα, IL-2Rβ和 IL-2Rγ_c 分布的影响

对照组(18:0)和 DHA(22:6)处理组细胞通过 Brij-58 裂解, 经密度离心分离得到细胞膜亚区域的不同组分. 通过免疫印记检测 caveolin-1, IL-2Rα, IL-2Rβ和 IL-2Rγ_c 的分布

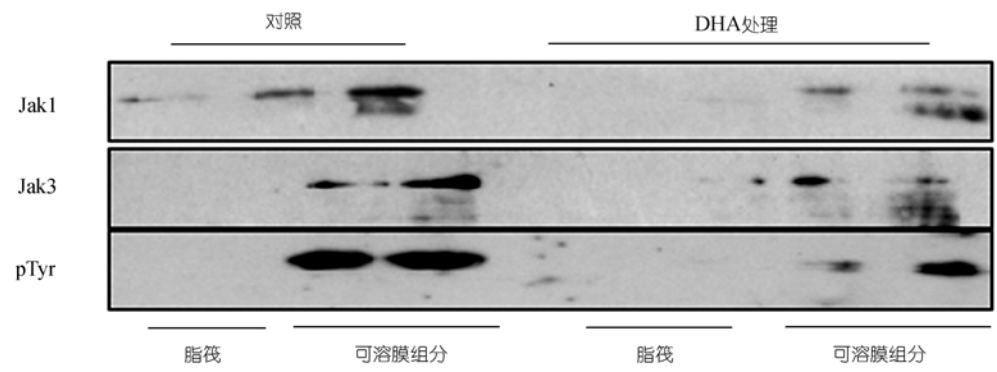

图 3　DHA 对 T 细胞膜不同组分中 Jak1, Jak3 和 phosphotyrosine(pTyr)分布的作用

对照组(18:0)和 DHA(22:6)处理组细胞通过 Brij-58 裂解, 经密度离心分离得到细胞膜亚区域的不同组分. 通过免疫印记检测 Jak1, Jak3 和 phosphotyrosine 的分布

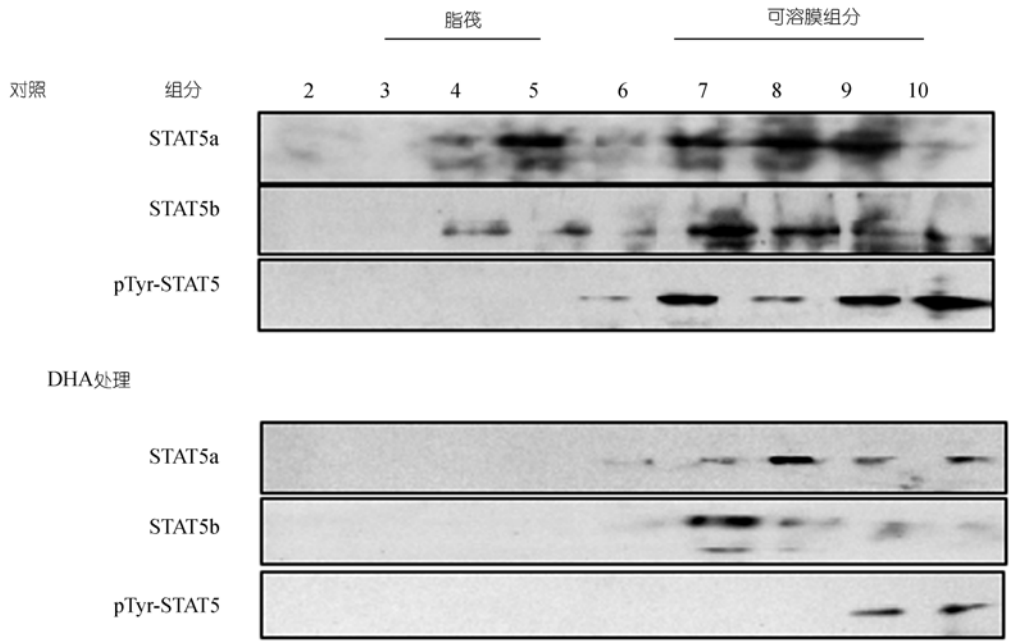

图 4 DHA 作用对 T 细胞膜不同组分中 STAT5a, STAT5b 和 pTyr-STAT5 分布的影响

对照组(18:0)和 DHA(22:6)处理组细胞通过 Brij-58 裂解，经密度离心分离得到细胞膜亚区域的不同组分．通过免疫印记检测 STAT5a, STAT5b 和 pTyr-STAT5 的分布

2.4 STAT5a 和 STAT5b 在膜亚细胞区域中的分布

图 4 的结果显示, 大部分 STAT5a 和 STAT5b 分布在可溶膜组分中, 而在脂筏组分中也检测到一定量的 STAT5a 和 STAT5b; 磷酸化的 STAT5 在可溶膜组分检测到. DHA 处理以后, 在脂筏没有检测到 STAT5a和STAT5b的存在, 只在可溶膜组分中检测到 STAT5a和 STAT5b蛋白; 另外, DHA 处理可以抑制磷酸化 STAT5 的表达.

2.5 DHA 改变细胞脂筏和可溶膜组分的脂肪酸组成

为研究 DHA 处理能否引起脂筏脂肪酸组成改变, 致使 IL-2 受体蛋白从脂筏移位到非功能性区域, 我们应用气相色谱法, 分析了 DHA 处理对脂肪微区域脂肪酸组成的作用. 结果表明, DHA 处理使脂筏中肉豆蔻酸(14:0)和棕榈酸(16:0) 水平显著升高(表 1), 而硬脂酸(18:0)、油酸(18:1 *n*-9)、顺式油酸(*cis*-18:1 *n*-9)水平显著降低, 亚麻酸(20:3 *n*-3)、二十二碳五烯酸(22:5 *n*-3)和二十二碳六烯酸(22:6 *n*-3) 水平显著升高. 多不饱和脂肪酸、*n*-3 多不饱和脂肪酸、*n*-3 多不饱和脂肪酸与 *n*-6 多不饱和脂肪酸比值在 DHA 处理的 T 细胞脂筏中显著高于对照组细胞. 由此可见, DHA 处理使脂筏中多不饱和脂肪酸组分, 主要是 *n*-3 多不饱和脂肪酸组分增加, 改变了细胞膜微区域的脂肪环境.

2.6 DHA 改变脂筏磷脂脂肪酰取代基团

如表 1 所示, DHA 可以改变脂筏的脂肪酸组成. 然后, 我们对 DHA 处理后膜亚区域不同磷脂包括磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)和鞘磷脂(sphingomyelin, SM)脂肪酰的构成进行了研究. DHA 处理增加了脂筏 PC 分子中 32:0 (16:0/ 16:0), 36:3(16:0/20:3, 18:1/18:2), 38:6 (18:1/20:5, 16:0/ 22:6, 18:2/20:4), 38:5(18:1/20:4, 18:2/20:3, 6:0/22:5)

表 1　对照组(18:0)和 DHA(22:6)处理组的脂筏微区域和可溶膜组分脂肪酸组分 a)

脂肪酸	脂筏	
	18:0	22:6
10:0	0.14±0.20	0.00±0.0
12:0	1.95±0.08	1.50±0.39
14:0	1.81±0.78	2.88±0.23 *
16:0	18.65±0.47	24.66±0.26 **
16:1(*n*-7)	3.08±1.54	3.92±0.17
18:0	21.18±4.81	9.83±2.38**
18:1(*n*-9)	29.08±0.06	16.56±0.92**
cis-18:1(*n*-9)	6.53±0.09	4.58±0.55***
18:2(*n*-6)	1.89±0.03	2.37±1.10
18:3(*n*-6)	0.00±0.00	0.00±0.00
18:3(*n*-3)	0.03±0.04	0.00±0.00
20:0	0.30±0.27	0.00±0.00
20:2(*n*-6)	1.03±0.07	1.81±0.75
20:3(*n*-6)	6.66±3.34	10.39±1.72
20:3(*n*-3)	0.06±0.01	0.37±0.05 ***
20:4(*n*-6)	6.25±0.61	4.17±0.67
22:0	0.10±0.04	0.00±0.00
20:5(*n*-3)	0.58±0.19	1.18±0.31
22:5(*n*-3)	0.30±0.12	1.00±0.15**
22:6(*n*-3)	0.31±0.14	15.30±0.48***
Saturated fatty acid	44.13±2.62	38.86±1.06
Monounsaturated fatty acids	38.70±0.98	25.06±1.74***
PUFAs	16.74±5.40	36.58±6.03***
∑(*n*-3)PUFA	0.93±0.55	17.85±0.05***
∑(*n*-6)PUFA	15.83±2.11	18.73±0.87
(*n*-3)/(*n*-6)	0.05±0.04	0.95±0.05***

a) 脂肪酸含量的测定为 3 次独立实验取平均值(mean ± S.E), 以 mol%表示, 表示 DHA 处理组和对照组脂筏组分之间比较的显著性差异(* 示 P<0.05; ** 示, P<0.01; *** 示 P<0.001)

和 40:6(18:1/22:5, 18:0/22:6, 20:3/20:3, 20:2/20:4)脂肪酰取代基团(表 2); SM 中脂肪酰取代基团 38:3 在 DHA 处理的脂筏显著高于对照组细胞. DHA 处理增加了脂筏 PE 中 36:5(16:0/20:5), 36:5 (16:1/20:4), 38:6(16:0/22:6, 18:2/20:4), 38:5(18:0/20:5, 16:0/22:5, 18:1/20:4), 40:7(18:1/22:6), 40:6(20:2/20:4, 18:2/22:4, 18:0/22:6, 18:1/22:5) 和 40:5(18:0/22:5, 18:1/22:4, 18:2/22:3, 20:1/20:4) 脂肪酰取代基团(表 3); PS 分子构成中 38:4(18:0/20:4), 40:6(18:0/22:6)和 40:5 (18:0/22:5)脂肪酰取代基团高于对照组细胞(表 3); PI 构成中 36:4(16:0/20:4), 40:6(18:0/22:6), 40:5(18:0/22:5), 36:1(18:0/18:1)和 38:5(18:1/20:4)脂肪酰取代基团, 在 DHA 处理的脂筏显著高于对照组细胞(表 3).

3　讨论

最近研究表明, 一些重要的受体蛋白都存在于脂筏内, 在该区域中活化, 进行信号传导过程[16~18], EPA可能引起脂筏生化改变, 使一些重要受体蛋白移位到非功能区域中, 进行免疫调节[14]; DHA是一种重要的*n*-3 多不饱和脂肪酸, 是一种免疫营养素, 其免疫调节分子机理尚不清楚[19], 关于PUFAs对膜脂肪微区中IL-2 受体信号传导的作用, 尚无报道. 关于IL-2R在细胞膜亚区域分布的研究目前尚无定论, 我们检测到IL-2Rα, IL-2Rβ和IL-2Rγ_c链都存在于脂筏组分中. 我们的研究结果与Matkó等人[20]报道的一致, 确定IL-2R亚基都存在脂筏中, 但是另有报道认为IL-2Rα存在于脂筏中, 而IL-2Rβ和IL-2Rγ_c存在于可溶膜组分中[21]. 最近又有报道在脂筏中检测到IL-2Rα, IL-15Rα, IL-2/15Rβ和IL-2Rγ_c[22]. 关于多不饱和脂肪对脂筏IL-2R蛋白的作用未见报道, 我们发现用DHA处理后, 可使脂筏部分IL-2Rα, IL-2Rβ和IL-2Rγ_c蛋白移位到可溶膜组分中, DHA引起的IL-2R蛋白的移位对于IL2 受体信号传导作用十分重要.

目前有关Jak激酶与脂筏关系报道很少[22,23], Jaks存在于脂筏中, 还是在可溶膜组分中尚无一致结论[23]. 我们在可溶膜组分中, 而不是在脂筏中检测Jak1, Jak3 和磷酸酪氨酸蛋白表达.

按目前的理论STAT家族蛋白应存在于胞浆和核内[24~30], 至今仅有Sehgal[31]在脂筏组分检测到STAT1和STAT3, 并提出了raft-STAT信号传导假说. 我们试验发现, 在可溶膜组分和脂筏组分中都检测到STAT5a, STAT5b蛋白, 但仅在可溶膜组分中检测到磷酸化STAT5, 推测在脂筏组分存在的STATs可能是细胞因子信号传导通路早期暂短的一个阶段, 脂筏组分可能存在不同细胞因子与STATs作用的生理位点, 有关STATs在膜中脂肪微区域的功能有待进一步研究.

为研究 DHA 对脂筏中 IL-2R 信号传导的作用的分子基础, 我们分析了 DHA 对脂筏中脂肪酸组成成分的影响, 以及对磷脂分子(PC, SM, PI, PE, PS)构成中脂肪酸酰取代基团的影响, 发现 DHA 使脂筏中多不饱和脂肪酸组分增加(表 1), 亚麻酸(20:3 *n*-3)、二

表 2 对照组(18:0)和 DHA(22:6)处理组脂筏和可溶膜组分磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂(SM)脂肪酰取代基团含量 a)

m/*z*	脂肪酸	18:0	22:6
	磷脂酰胆碱		
718	32:0 (16:0/16:0)	2.71 ±0.73	8.30±1.38***
742	34:2 (16:0/18:2)	4.78±0.73	5.39±0.70
744	34:1 (16:0/18:1)	12.10±5.17	16.23±3.84
764	36:3 (16:0/20:3,18:1/18:2)	0.75±0.18	11.74±0.24*
766	36:4 (16:0/20:4 18:2/18:2)	1.10±0.31	1.61±0.37
768	36:3 (16:0/20:3,18:1/18:2)	2.01±1.04	2.47±0.34
790	38:6(18:1/20:5,16:0/22:6,18:2/20:4)	0.96±0.33	4.32±0.72***
792	38:5(18:1/20:4,18:2/20:3,16:0/22:5)	0.90±0.36	1.94±0.17**
818	40:6(18:1/22:5,18:0/22:6,20:2/20:4)	1.24±069	2.55±0.09*
820	40:5(18:0/22:5)	0.98±0.34	1.34±0.26
	鞘磷脂		
685	34:2	1.06±0.35	1.57±0.25
687	18:1/18:0	15.57±7.88	23.14±10.34
739	38:3	0.53±0.16	1.08±0.10**
745	38:0	0.68±0.22	0.89±0.35
815	43:0	3.74±2.01	4.77±2.97

a) 通过 ESI-MS 测定(mean ± S.E), 以每纳克(ng)磷对应的内标 DMPC 的纳克数表示. 星号表示 DHA 处理组和对照组脂筏组分之间比较的显著性差异(* 示 $P<0.05$; ** 示 $P<0.01$; *** 示 $P<0.001$)

表 3 对照组(18:0)和 DHA(22:6)处理组 T 细胞脂筏和可溶膜组分中磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)和磷脂酰丝氨酸(PS)脂肪酰取代基团含量 a)

m/*z*	脂肪酸	18:0	22:6
	磷脂酰乙醇胺		
720	36:5(p16:0/20:5)	4.15±1.12	14.02±2.33***
736	36:5 (16:1/20:4)	2.56±0.58	3.36±0.19**
750	38:4 (18:0/20:4, 16:0/22:4)	52.14±17.36	60.04±5.60
760	38:7(18:1/20:6, 16:1/22:6)	0.78±0.20	3.97±0.22
762	38:6(16:0/22:6,18:2/20:4)	1.53±0.01	12.31±1.78***
764	38:5(18:0/20:5,16:0/22:5, 18:1/20:4)	8.23±2.43	15.33±1.15***
766	38;4(18:0/20:4, 16:0/22:4, 18:2/20:2)	32.72±9.69	41.45±1.68
778	40:4(20:0/20:4, 18:0/22:4)	21.79±7.90	15.03±5.66
788	40:7(18:1/22:6)	1.17±0.13	13.25±0.38**
790	40:6(20:2/20:4, 18:2/22:4,18:0/22:6, 18:1/22:5)	4.02±0.80	43.07±1.93***
792	40:5(18:0/22:5, 18:1/22:4, 18:2/22:3, 20:1/20:4)	2.25±1.15	14.31±2.56***
	磷脂酰丝氨酸		
788	36:1(18:0/18:1)	2.24±1.11	3.08±0.36
810	38:4(18:0/20:4)	0.67±0.07	2.58±1.16*
834	40:6(18:0/22:6)	0.67±0.20	3.06±0.85*
836	40:5(18:0/22:5)	0.88±0.41	5.52±2.18*
838	40:4(18:0/22:4)	1.37±0.66	2.16±1.37
909	40:6 (18:0/22:6)	2.42±1.45	1.83±1.13
	磷脂酰肌醇		
857	36:4 (16:0/20:4)	0.62±0.17	0.97±0.23**
861	36:2 (18:0/18:2)	3.52±1.59	3.99±1.01
863	36:1(18:0/18:1)	1.70±0.65	2.65±0.26*
883	38:5(18:1/20:4)	3.09±1.21	3.93±0.87*
885	38:4 (18:0/20:4)	15.65±8.23	17.02±2.11
909	40:6(18:0/22:6)	0.48±0.19	5.56±0.78**
911	40:5(18:0/22:5)	0.82±0.27	2.27±0.51**
913	40:4(18:0/22:4)	1.52±0.63	1.46±0.58

a) 通过 ESI-MS 测定(mean ± S.E), 以每纳克(ng)磷对应的内标 DMPC 的纳克数表示. 星号表示 DHA 处理组和对照组脂筏组分之间比较的显著性差异(* 示 $P<0.05$; ** 示 $P<0.01$; *** 示 $P<0.001$)

十二碳五烯酸(22:5 *n*-3)和二十二碳六烯酸(22:6 *n*-3)水平显著升高. 多不饱和脂肪酸、*n*-3 多不饱和脂肪酸和 *n*-3 多不饱和脂肪酸与 *n*-6 多不饱和脂肪酸比值显著高于对照组细胞. 另外, DHA 处理使脂筏中饱和脂肪酸肉豆蔻酸 (14:0)和棕榈酸(16:0) 水平显著升高, 而硬脂酸(18:0)、油酸 18:1(*n*-9)、顺式油酸 *cis*-18:1(*n*-7)水平显著降低, 这些脂肪酸组成成分的改变可能是由于细胞在 DHA 处理后, 为维持其脂筏的脂肪组成, 形成了脂肪酸部分代偿性改变, 目前这种脂肪代谢的改变机理尚不清楚.

由于PUFAs通过脂肪酰基的蛋白翻译后调节引起蛋白从脂筏移位, 影响脂筏蛋白功能[10]. 膜蛋白脂肪酰部分位于膜的胞浆侧, 膜胞外侧磷脂的改变对蛋白在膜亚区域的分布会产生间接的作用[5]. 磷脂酰胆碱和鞘磷脂是位于脂筏中胞浆侧磷脂, 而磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇是胞外侧磷脂, 这些分子中脂肪酰基的改变可能对受体蛋白从功能性脂筏移位有特别的作用. 相关研究表明, EPA可增加细胞脂筏中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和鞘磷脂分子构成中多不饱和脂肪酰取代基团[5], 而DHA对脂筏的磷脂构成中脂肪酰取代基团的改变未见报道, 本研究中, 我们分析了DHA处理对脂筏中胞浆侧磷脂(PC, SM)(表 2)和胞外侧磷脂(PE, PI, PS) 分子构成中脂肪酰取代基团的作用(表 3). 如表 2 所示, DHA处理显著增加了磷脂酰胆碱分子中多不饱和脂肪酰取代基团, 如 36:3(16:0/20:3), 38:6 (18:1/20:5, 16:0/22:6, 18:2/20:4), 38:5(18:1/20:4, 18:2/20:3, 16:0/22:5) 和 40:6 (18:1/22:5, 18:0/22:6, 20:3/20:3, 20:2/20:4)脂肪酰取代基团. 鞘磷脂分子是由胆碱头部、神经酰胺和脂肪酸尾部三部分构成, 用ESI/MS系统很难将其打碎, 故只能在表 3 中列出脂肪酸和神经酰胺两部分碳原子和不饱和键总数. DHA处理后脂筏中鞘磷脂构成 38:3 脂肪酰取代基团显著增加(表 2); 脂筏中磷脂酰乙醇胺分子构成中多不饱和脂肪酰取代基团(20:4, 20:5, 22:6, 22:5, 22:4)在 DHA处理后也显著增加(表 3); 而磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇分子构成中多不饱和脂肪酰取代基团(20:4, 22:6, 22:5)在 DHA处理后显著增加(表 3). DHA处理改变了脂筏中磷脂分子构成中的脂肪酰取代基团, 这将对脂筏的结构和功能产生影响.

综上所述, DHA 处理可明显改变 T 细胞细胞脂筏脂肪环境, 影响 IL-2 受体信号传导通路重要蛋白在膜亚区域的分布. 本研究结果为了解 PUFAs 免疫调节作用的影响提供了重要依据.

参　考　文　献

1 Zurier R B. Fatty acids, inflammation and immune response. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1993, 48: 57~62 [DOI]

2 Brouard C, M Pascaud M. Effects of moderate dietary supplementations with *n*-3 fatty acids on macrophage and lymphocyte phospholipids and macrophage eicosanoid synthesis in the rat. Biochim Biophys Acta, 1990, 1047: 19~28

3 Rossetti R G, Seiler C M, DeLuca P, et al. Oral administration of unsaturated fatty acids: effects on human peripheral blood T lymphocyte proliferation. J Leuk Biol, 1997, 62: 438~443

4 Dillon S R, Mancini M, Rosen A, et al. Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation. J Immunol, 2000, 164: 1322~1332

5 Stulnig T M, Huber J, Leitinger N, et al. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. J Biol Chem, 2001, 276: 37335~37340 [DOI]

6 Stefanova I, Hořejší V, Ansotegui I J, et al. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. Science, 1991, 254: 1016~1019

7 Shenoy-Scaria A M, Kwong J, Fujita T, et al. Signal transduction through decay-accelerating factor. Interaction of glycosyl-phosphatidylinositol anchor and protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn 1. J Immunol, 1992, 149: 3535~3541

8 Moffett S, Brown D A, Linder M E. Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. J Biol Chem, 2000, 275: 2191~2198 [DOI]

9 Gratton J P, Fontana J, O'Connor D S, et al. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex *in vitro*. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. J Biol Chem, 2000, 275: 22268~22272 [DOI]

10 Stulnig T M, Berger M, Sigmund T, et al. Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. J Cell Biol, 1998, 43: 637~644 [DOI]

11 Holowka D, Sheets E D, Baird B. Interactions between FcωRI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. J Cell Sci, 2000, 113: 1009~1019

12 Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. Science, 1994, 266:1045~1047

13 李秋荣, 马　健, 汪　灏, 等. T 细胞膜脂肪微区域与白细胞介素-2α受体.肠内与肠外营养, 2004，11: 262~264

14 Horejsi V, Drbal K, Cebecauer M. GPI-microdomains: a role in signaling via immunoreceptors. Immunol. Today, 1999, 20: 356~361 [DOI]
15 Webb Y, Hermida-Matsumoto L, Resh M D. Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. J Biol Chem, 2000, 275: 261~270 [DOI]
16 Ilangumaran S, Arni S, van Echten-Deckert G, et al. Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes. Mol Biol Cell, 1999, 10: 891~905
17 Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. Nature, 1997, 387: 569~572 [DOI]
18 Jump D B. The Biochemistry of *n*-3 polyunsaturated fatty acids. J Biol Chem, 2002, 277: 8755~8758 [DOI]
19 Jolly C A, Jiang Y H, Chapkin R S, et al. Dietary (*n*-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. J Nutr, 1997, 127: 37~43
20 Matkó J, Bodnár A, Vereb G. GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. Eur J Biochem, 2002, 269: 1199~1208 [DOI]
21 Marmor M D, Julius M. Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. Blood, 2001, 98: 1489~1497 [DOI]
22 Ju H, Venema V J, Liang H, et al. Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signaling proteins in plasmalemmal caveolae. Biochem J, 2000, 351: 257~264 [DOI]
23 Goebel J, Forrest K, Morford L, et al. Differential localization of IL-2- and -15 receptor chains in membrane rafts of human T cells. J Leukocyte Biol, 2002, 72: 199~206
24 Vámosi G, Bodnár A, Vereb G, et al. Dietary docosahexaenoic acid suppresses t cell protein kinase c{theta} lipid raft recruitment and IL-2 production. J Immunol, 2004, 173: 6151~6160
25 Heinrich P C, Behrmann I, Muller-Newen G, et al. Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp130/Jak/STAT pathway. Biochem J, 1998, 334: 297~314
26 Darnell J E. STATs and gene regulation. Science, 1997, 277: 1630~1635 [DOI]
27 Leonard W J, O'Shea J J. Jaks and STATs: biological implications. Annu Rev Immunol, 1998, 16: 293~314 [DOI]
28 Darnell J E, Kerr I M, Stark G R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science, 1994, 264: 1415~1421
29 Sehgal P B, Guo G G, Shah M, et al. Cytokine signaling. STATs in plasma membrane rafts. J Biol Chem, 2002, 277: 12067~12074 [DOI]
30 Lin J X, Leonard W J. The role of STAT5a and STAT5b in signaling by IL-2 family cytokines. Oncogene, 2000, 19: 2566~2576 [DOI]
31 Sehgal P B. Plasma membrane rafts and chaperones in cytokine/STAT signaling. Acta Biochimica Polonica, 2003, 50: 583~594