

[引用格式] 徐乐, 吴梦娜, 邵鹏, 等. 二十二碳六烯酸对 IgE 介导的过敏反应的调节[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2026, 31(1): 34-45. DOI:10.19715/j.jmuzr.2026.01.04.

二十二碳六烯酸对 IgE 介导的过敏反应的调节

徐 乐^{1,2,3}, 吴梦娜^{1,2,3}, 邵 鹏^{1,2,3}, 张丽媛^{1,2,3},

黄世英^{1,2,3}, 林静瑜^{1,2,3}, 李桂玲^{1,2,3}

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021;

3. 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为了探究二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 对过敏反应的调节作用和可能的机制, 以 IgE/BSA 诱导的 RBL-2H3 细胞为研究对象, 通过测定 β -氨基己糖苷酶的释放, 建立细胞过敏模型; 进一步用 ELISA 法测定组胺及细胞因子释放量, 并用 Fluo-3 AM 荧光探针法测定钙离子浓度; 用定量逆转录聚合酶链式反应 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 测定细胞因子及高亲和力受体 Fc ϵ RI 亚基的表达水平; 用蛋白质免疫印迹法测定 Fc ϵ RI 信号通路蛋白的表达。结果显示, RBL-2H3 敏化细胞经 DHA 处理后, 其 β -氨基己糖苷酶、组胺的释放率及细胞内钙离子浓度显著降低, 说明 DHA 具有抗过敏作用。qRT-PCR 检测结果表明, DHA 处理能显著降低 Fc ϵ RI α 亚基的表达, 但对 Fc ϵ RI β 和 Fc ϵ RI γ 基因表达无显著影响。进一步的 Western Blot 检测结果显示, DHA 能显著抑制 RBL-2H3 敏化细胞中 PLC γ /JNK 和 Akt/NF- κ B 信号通路的活性, 从而降低下游炎症细胞因子 IL-4 和 TNF- α 的释放量。可见, DHA 通过抑制 PLC γ /JNK 和 Akt/NF- κ B 信号通路的活性降低 IgE 介导的 RBL-2H3 细胞过敏反应。

[关键词] 二十二碳六烯酸; 过敏反应; 细胞因子; 不饱和脂肪酸; 信号通路

[中图分类号] TS 254.1 [文章编号] 1007-7405(2026)01-0034-12 DOI:10.19715/j.jmuzr.2026.01.04

Regulation of Docosahexaenoic Acid Against IgE-Mediated Allergic Reaction

XU Le^{1,2,3}, WU Mengna^{1,2,3}, SHAO Peng^{1,2,3}, ZHANG Liyuan^{1,2,3},

HUANG Shiyong^{1,2,3}, LIN Jingyu^{1,2,3}, LI Guiling^{1,2,3}

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Marine Functional Food Engineering Technology Research Center of Fujian Province, Xiamen 361021, China;

3. Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

Abstract: To explore the regulatory effect of DHA on allergic reaction and the possible mechanism, IgE/

[收稿日期] 2025-03-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (31771972); 福建省自然科学基金项目 (2020J01676); 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心开放基金项目

[通信作者] 共同第一作者: 吴梦娜, 硕士生, 从事食品安全控制技术方向研究, E-mail: wmn_2000@qq.com。李桂玲, 博士, 教授, 从事分子营养学与表观遗传学方向研究, E-mail: glli2016@jmu.edu.cn。林静瑜, 硕士, 讲师, 从事生物酶学研究, E-mail: jylin@jmu.edu.cn

BAS-induced RBL-2H3 cells were used as the study object and the release of β -hexosidase was measured to establish the allergy cellular model. Furthermore, histamine and cytokines were determined by ELISA. Calcium ion concentration was determined using the Fluo-3 AM fluorescence probe. The expression levels of cytokines and high affinity receptor Fc ϵ RI subunits were determined by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The expression of Fc ϵ RI signal pathway protein was determined by protein immunoblotting method. The results showed that the release amount of β -hexosidase and histamine, as well as the intracellular calcium concentration of sensitized RBL-2H3 cells were significantly reduced upon DHA treatment, suggesting that DHA had an anti-allergic effect. Moreover, the qRT-PCR results showed that DHA treatment significantly reduced the gene expression of *Fc ϵ RI α* subunits without obvious effect on *Fc ϵ RI β* and *Fc ϵ RI γ* subunit expression. Further Western blot studies showed that DHA significantly inhibited the activity of the PLC γ /JNK and Akt/NF- κ B signal pathways in sensitized RBL-2H3 cells, thereby reducing the release of downstream inflammatory cytokines IL-4 and TNF- α . In summary, DHA inhibits IgE-mediated allergic reactions in RBL-2H3 cells by inhibiting the activity of PLC γ /JNK and Akt/NF- κ B signal pathways.

Keywords: docosahexaenoic acid; allergic response; cytokines; unsaturated fatty acid; signal pathway

0 引言

食物过敏是全球性的公共卫生问题，它是由食物中的成分引起、免疫球蛋白 E (IgE) 介导的免疫系统异常反应^[1]。抗原刺激产生的 IgE 与肥大细胞等效应细胞表面的高亲和力受体 (Fc ϵ RI) 结合形成复合物，当抗原再次进入机体激活效应细胞后，Fc ϵ RI 将信号传递到细胞内，通过一系列反应促进细胞释放颗粒物质^[2]。效应细胞释放的颗粒物质主要是组胺和 β -氨基己糖苷酶，其他还包括 IL-4、TNF- α 等炎症因子^[3]。这些颗粒物质和炎症因子会造成组织器官的异常反应。RBL-2H3 细胞是从大鼠嗜碱性细胞中分离和克隆出来的嗜碱性白血病细胞株^[4]，它表达 IgE 的高亲和力受体 Fc ϵ RI，通过聚集这些受体或与钙离子载体协同作用激活细胞分泌组胺、IL-4 和 IL-13 等细胞因子^[5]。因 RBL-2H3 细胞与肥大细胞具有相似的特性，所以它常被用作过敏反应研究的体外细胞模型。

二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 是一种重要的 ω -3 多不饱和脂肪酸，它是人体的必需脂肪酸，是大脑细胞膜和视网膜的重要组成成分^[6]。大量研究表明，DHA 具有降血脂^[7]、抗氧化^[8]、抗癌^[9]、抗血小板聚集^[10]和抗肥胖^[11]等生理功能。还有研究指出，DHA 膳食补充确实能降低癌症、心血管疾病、糖尿病和肥胖症的患病风险^[12]，而且富含 DHA 的鱼油可以降低小鼠和豚鼠的过敏反应。DHA 能抑制树突状细胞中的共刺激分子 CD80 和 CD86 的表达，并减少炎性细胞因子的产生及 T 细胞增殖^[13]。人体多数的疾病均与免疫系统紊乱有关^[14]，而 DHA 是否及如何参与过敏等免疫反应的调控还有待进一步明确。

如今食物过敏已经成为全球性的安全问题，再加上过敏原的管理体系尚不完善，食物过敏的患者日益增加^[15]。治疗或缓解过敏的药物大多具有一些副作用，除了隔离过敏原外，人们也期待使用天然无毒的活性成分来缓解和预防过敏反应。DHA 是主要存在于鱼类、贝类等海鲜中的多活性食品功能成分，但它对食物过敏反应的调节作用及机制尚不明确^[16]。因此，本研究以 IgE/BSA 诱导的 RBL-2H3 细胞为过敏模型，检测 DHA 对敏

化细胞脱颗粒效率和 IL-4、TNF- α 等细胞因子释放的影响,并进一步探究过敏相关信号通路的活性表达情况,初步阐释 DHA 对过敏反应的调控机制,为探究 ω -3 多不饱和脂肪酸的活性作用机制及开发缓解食物过敏反应的活性物质提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

RBL-2H3 细胞由中国科学院上海细胞库提供;胎牛血清 (美国 PAN);青霉素-链霉素双抗液 (美国 Gibco);MEM 培养基 (美国 Hyclone);台式液和 DHA (北京索莱宝);ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (日本 TOYOBO);SYBR Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒 (长沙艾科瑞);组胺 ELISA 检测试剂盒 (德国 IBL international);Fluo-3 AM 试剂 (美国 Sigma-Aldrich);TNF- α 和 IL-4 ELISA 检测试剂盒 (武汉 Elabscience);IgE (美国 Sigma-Aldrich);BSA (美国 Biosearch Technologies);TRIzol 试剂 (北京聚合美);ECL 发光液 (美国 Zeta life);p-PLC γ Antibody、p-JNK Antibody 和 JNK Antibody (美国 CST);PLC Antibody (武汉 ABclonal);NF- κ B Antibody (武汉 ProteinTech);p-Akt Antibody 和 Akt Antibody (上海 Beyotime);GAPDH Antibody (江苏 Affinity Biosciences)。

Synergy HI 多功能酶标仪,美国 BioTek。

1.2 实验方法

1) RBL-2H3 细胞培养与过敏模型的建立。参照文献 [17] 的方法。RBL-2H3 细胞用含 15% (质量分数)胎牛血清和 1% (质量分数)青霉素-链霉素的 MEM 培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% (体积分数) CO_2 的恒温恒湿细胞培养箱中连续培养。为了建立过敏细胞模型, RBL-2H3 细胞以 3×10^4 个/孔接种于 96 孔板,每孔加入质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L 的 IgE 培养 18 h,弃上清液后每孔加入 100 μL 含有 0.25 mg/L BSA 的台式液,并在细胞培养箱中孵育 1 h。通过检测 β -氨基己糖苷酶的释放率确定 IgE 的最佳作用浓度;或在最佳 IgE 浓度刺激 18 h 后,弃上清液,加入 100 μL 分别含有 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 mg/L BSA 的台式液孵育 1 h,根据 β -氨基己糖苷酶释放率选择最佳的 BSA 作用浓度,构建过敏 RBL-2H3 细胞模型。为了检测 DHA 对细胞过敏反应的影响,细胞与 IgE 共培养 18 h 后,再添加 DHA 和 BSA 共同处理一定时间,然后进行相关检测。

2) β -氨基己糖苷酶的检测。将 RBL-2H3 细胞以 3×10^4 个/孔接种到 96 孔板中,经 0.2 mg/L IgE 敏化 18 h 后,每孔加入不同浓度的 DHA (50, 100 $\mu\text{mol/L}$) 和 0.5 mg/L BSA 并共同孵育 1 h 后进行检测。有研究显示,姜黄素具有抗过敏的作用^[18],因此本研究以姜黄素作为阳性对照。细胞处理后以 4000g 离心 5 min 收集上清培养液;细胞用含 2% (质量分数) Triton X-100 的裂解液振荡 5 min,释放细胞内 β -氨基己糖苷酶。从上清液和细胞裂解液中各取 25 μL 加入 96 孔板,再向每孔中加入 100 μL 浓度为 1.2 mmol/L 的 β -氨基己糖苷酶底物溶液。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min 后,用酶标仪检测发射波长为 450 nm 和激发波长为 360 nm 下的荧光度值 (F), β -氨基己糖苷酶释放率的计算公式^[19]为:

β -氨基己糖苷酶释放率 = $F_{\text{上清}} / (F_{\text{上清}} + F_{\text{细胞}}) \times 100\%$ 。

3) 组胺的检测。将 RBL-2H3 细胞以 6×10^5 个/孔接种到 12 孔板中, 经 0.2 mg/L IgE 敏化 18 h 后, 每孔加入不同浓度 DHA (50、100 $\mu\text{mol/L}$) 和 0.5 mg/L BSA 共同孵育 30 min。收集细胞上清液用大鼠组胺 ELISA 试剂盒测定组胺的含量。按照 ELISA 试剂盒说明书将样品进行反应, 用酶标仪检测 450 nm 和 630 nm 的吸光度值。根据组胺标准品的 450 nm 和 630 nm 吸光度值之差绘制浓度标准曲线, 根据曲线计算细胞上清液样品的组胺含量。

4) Ca^{2+} 浓度的检测。将 RBL-2H3 细胞以 3×10^4 个/孔接种到 96 孔板中, 经 0.2 mg/L IgE 敏化 18 h 后, 用 HBSS 洗涤 2 次, 每孔加入 100 μL 的 Fluo-3 AM 工作液并孵育 1 h。然后 F 值最大的孔加入 5 μL 的 2% (质量分数) Triton X-100, F 值最小的孔加入 5 μL 的 100 mmol/L EGTA, 实验样品加入对应浓度的 DHA (50 $\mu\text{mol/L}$ 或 100 $\mu\text{mol/L}$), 以不含 DHA 的 HBSS 缓冲液为对照, 再加入 0.5 mg/L BSA 激发 30 min。最后, 每孔加入 25 $\mu\text{mol/L}$ A23187 并利用多功能酶标仪测定荧光度值。 Ca^{2+} 浓度的计算公式为: $[\text{Ca}^{2+}] = K_d [(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)]$, 其中, K_d 为 Fluo-3 的解离常数 (450 nmol/L)^[20]。

5) qRT-PCR 检测。将 RBL-2H3 细胞以 6×10^5 个/孔接种到 12 孔板中, 经 0.2 mg/L IgE 过夜培养后, 每孔加入不同浓度 DHA (50 $\mu\text{mol/L}$ 或 100 $\mu\text{mol/L}$) 和 0.5 mg/L BSA 共同孵育 1 h。收集细胞用 TRIzol 试剂提取总 RNA。RNA 使用 TOYOBO 试剂盒进行反转录, 然后用 SYBR Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应。以 GAPDH 为内参, 本研究所用引物的序列如表 1 所示。

表 1 所用 qRT-PCR 引物的信息
Tab. 1 Primer sequences used for qRT-PCR

引物名称	正向引物序列	反向引物序列
<i>TNF-α</i>	5'-CGGAATTCGGCTCCCTCTCATCAGTTC-3'	5'-GCTCTAGACCCTTGAAGAGAACCTGGG-3'
<i>IL-4</i>	5'-GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'	5'-GTGTTCCCTTGTTCGCCGTAAG-3'
<i>FcϵRIα</i>	5'-CATTGTGAGTGCCACCATTTC-3'	5'-TTCTTCCAGCTACGGCATCT-3'
<i>FcϵRIβ</i>	5'-TTGTCTGCTCCACACTCCAG-3'	5'-AGGCTGCCTCTCACCAGATA-3'
<i>FcϵRIγ</i>	5'-CACCTGTTCTCAGCTGCATT-3'	5'-GGATCAGGGAAGGAAAGAGG-3'
<i>GAPDH</i>	5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'	5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3'

6) TNF- α 和 IL-4 的 ELISA 检测。将 RBL-2H3 细胞以 6×10^5 个/孔接种到 12 孔板中, 经 0.2 mg/L IgE 敏化 18 h 后, 每孔加入不同浓度的 DHA (50 $\mu\text{mol/L}$ 或 100 $\mu\text{mol/L}$) 和 0.5 mg/L BSA 继续孵育 2 h。收集细胞上清液, 按照大鼠 ELISA 试剂盒中说明书的要求进行反应, 用酶标仪测定样品 450 nm 波长下的吸光度值。根据 TNF- α 和 IL-4 标准品的 450 nm 吸光度值标准曲线, 计算细胞上清液样品中 TNF- α 和 IL-4 的释放量。

7) 免疫印迹。将 RBL-2H3 细胞以 6×10^5 个/孔接种到 12 孔板中, 与 0.2 mg/L IgE 过夜培养后, 每孔加入不同浓度 DHA (50 $\mu\text{mol/L}$ 或 100 $\mu\text{mol/L}$) 和 0.5 mg/L BSA 共同孵育 2 h。弃去培养基收集细胞沉淀, 每个样品加入适量 IP 裂解液 (含适量蛋白酶抑制

剂和磷酸酶抑制剂) 提取总蛋白质, 并采用 BCA 法测定总蛋白质浓度。将等量的蛋白质变性后, 进行 8% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 并采用湿转法将蛋白质转移至 0.22 μm 的 PVDF 膜。将膜用 5% (质量分数) 脱脂奶 (TBST 配制) 于室温封闭 1 h 后, 与稀释好的一抗在室温 2 h 或 4 ℃ 过夜孵育; 洗去多余的抗体后, 与二抗在室温环境下孵育 1 h, 最后用 ECL 发光液进行显影。

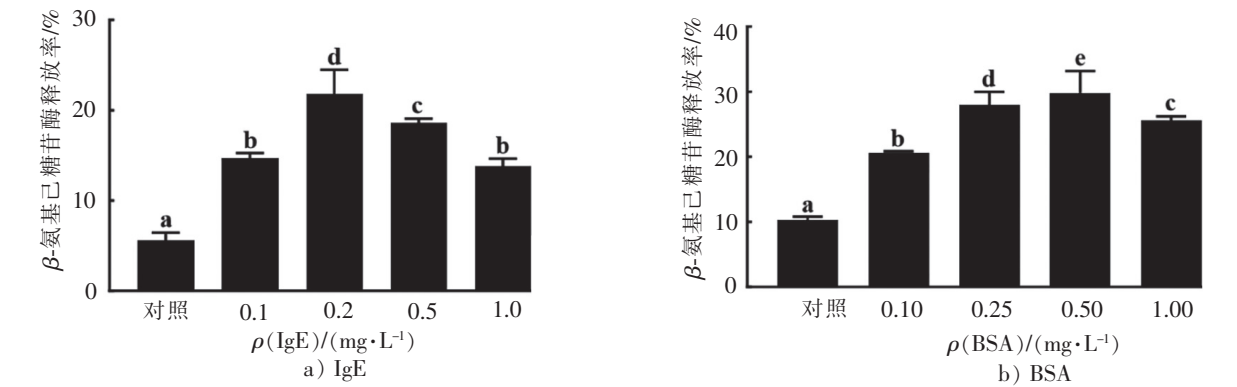
1.3 统计学分析

所有实验均重复 3 次, 结果以平均值 ± 标准差表示。采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异极具有统计学意义。采用 GraphPad Software Prism 8.0 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 RBL-2H3 细胞过敏模型的建立

本研究采用 IgE 和 BSA 刺激 RBL-2H3 细胞, 并以未刺激诱导的样品为空白对照, 然后检测 β-氨基己糖苷酶的释放率以判断过敏反应的程度。RBL-2H3 细胞首先用 0.1 ~ 1.0 mg/L IgE 处理 18 h, 再加入 0.25 mg/L BSA 作用 1 h, 最后收集上清液并检测细胞 β-氨基己糖苷酶释放率, 确定诱导过敏反应的最佳 IgE 作用浓度。同样, 用最佳浓度 IgE 刺激 18 h 后再用 0.1 ~ 1.0 mg/L BSA 作用 1 h, 根据最大 β-氨基己糖苷酶释放率确定最佳 BSA 作用浓度。如图 1 所示, 与对照组相比, 加入质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L 的 IgE 刺激后, 细胞的 β-氨基己糖苷酶释放率分别增加约 1.6 倍、3 倍、2.3 倍、1.5 倍 ($P < 0.05$)。因此, 在后续实验中选择 0.2 mg/L 的 IgE 来诱导过敏反应。固定诱导的 IgE 浓度后, 随着 BSA 作用浓度的增加, 细胞 β-氨基己糖苷酶释放率逐渐上升, 到最高值后稍有下降。与对照相比, 当 BSA 质量浓度在 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 mg/L 时, 细胞 β-氨基己糖苷酶释放率分别增加约 1 倍、1.7 倍、1.9 倍和 1.5 倍 ($P < 0.05$)。因此, 在后续实验中, BSA 选择 0.50 mg/L 作为诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒的最适作用浓度。



注: 柱子上的不同小写字母表示差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

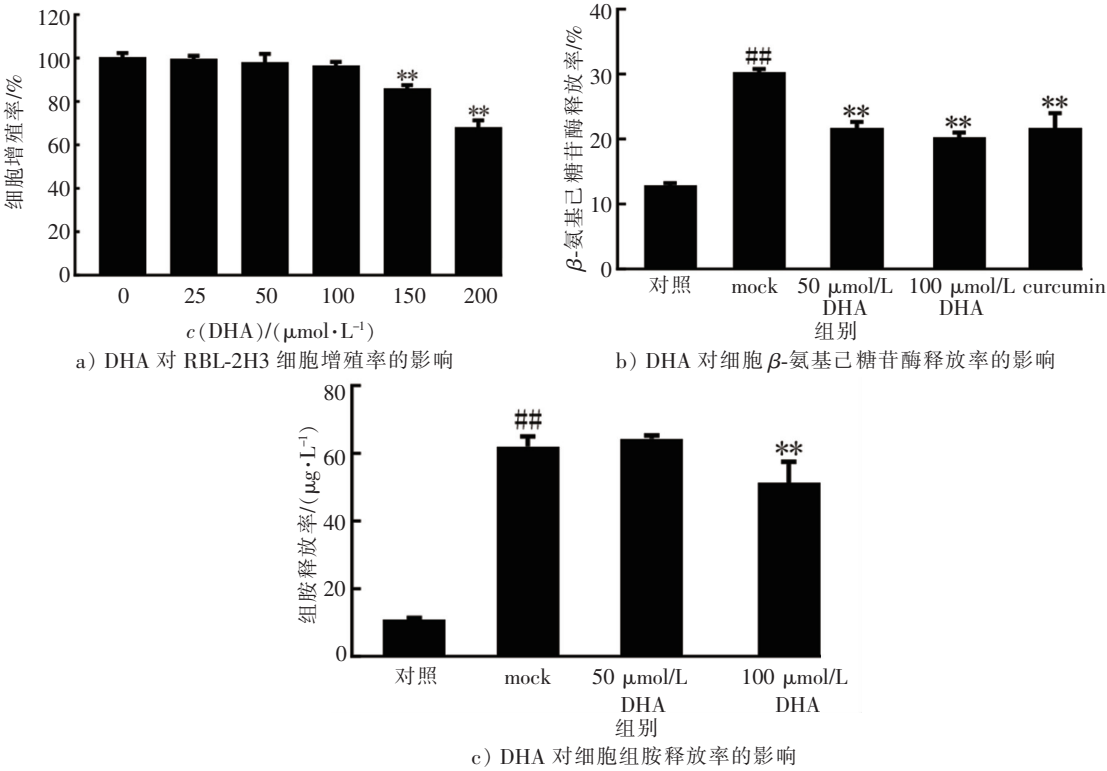
图 1 不同浓度的 IgE 和 BSA 对细胞 β-氨基己糖苷酶释放率的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of IgE and BSA on the release rate of β-glucosidase

2.2 DHA 对 RBL-2H3 细胞增殖率及脱颗粒的影响

为探究 DHA 作用 RBL-2H3 细胞的合适浓度,细胞用 25 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ DHA 处理 48 h 后用 MTT 法检测细胞增殖率。DHA 浓度对 RBL-2H3 细胞增殖率的影响如图 2a 所示。可见,与乙醇溶剂的对照相比,25,50,100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 处理 48 h 对 RBL-2H3 细胞增殖率均无显著影响,随着 DHA 浓度的继续升高,细胞增殖率开始下降,150,200 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用下细胞增殖率分别下降约 15% ($P < 0.01$),30% ($P < 0.01$)。因此,在后续实验中,选择 50,100 $\mu\text{mol/L}$ 作为 DHA 作用 RBL-2H3 细胞 48 h 的浓度。

为探究 DHA 对 RBL-2H3 细胞过敏反应的影响,根据上文确定的 IgE/BSA 致敏条件激活 RBL-2H3 细胞,然后分别检测不同浓度 DHA 作用后细胞释放颗粒物 β -氨基己糖苷酶和组胺的变化,结果如图 2b、图 2c 所示。可见,与阴性对照相比,IgE/BSA 敏化细胞的 β -氨基己糖苷酶释放率增加了约 2.5 倍 ($P < 0.01$)。进一步用 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用后, β -氨基己糖苷酶释放率分别下降约 30% 和 35% ($P < 0.01$),与阳性对照姜黄素的抑制效果相差不大,即 DHA 处理 48 h 抑制了 β -氨基己糖苷酶释放。与阴性对照相比,IgE/BSA 刺激后组胺释放率显著提高 4.8 倍 ($P < 0.01$);同时用 50 $\mu\text{mol/L}$ DHA 处理后,组胺释放率无显著差异,而添加 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 使组胺释放量显著下降约 20% ($P < 0.01$)。以上结果表明,DHA 对致敏的 RBL-2H3 细胞的 β -氨基己糖苷酶和组胺释放率有显著抑制作用,且呈现浓度依赖性,即 DHA 可抑制 IgE/BSA 诱导的肥大细胞脱颗粒。

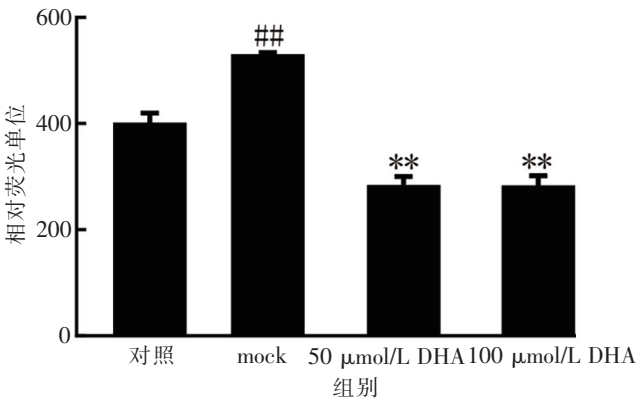


注:图 a 中,设溶剂对照组细胞增殖率为 100%,与溶剂对照相比,**表示差异极具有统计学意义;图 b 和图 c 中,对照为不做任何处理, mock 为 IgE/BSA 诱导的模型;与对照相比,## 表示差异极具有统计学意义;与 mock 相比,**表示差异极具有统计学意义。

图 2 DHA 对 IgE/BSA 诱导的 RBL-2H3 细胞增殖率和脱颗粒的影响
Fig.2 Effect of DHA on IgE/BSA-induced proliferation and degranulation in RBL-2H3 cells

2.3 DHA 抑制致敏 RBL-2H3 细胞的 Ca^{2+} 内流

Ca^{2+} 在细胞信号传导中起着关键作用，会引起免疫细胞的活化，包括吞噬作用、细胞因子的产生和炎症介质的释放。图 3 是 DHA 对敏化 RBL-2H3 细胞内 Ca^{2+} 影响的检测结果。可见，与阴性对照相比，IgE/BSA 刺激后细胞内 Ca^{2+} 浓度增加约 30% ($P < 0.01$)；而进一步加入 DHA 处理 1 h 后，细胞内 Ca^{2+} 浓度显著减少约 40% ($P < 0.01$)。这些结果说明，DHA 可抑制致敏 RBL-2H3 细胞的 Ca^{2+} 内流。

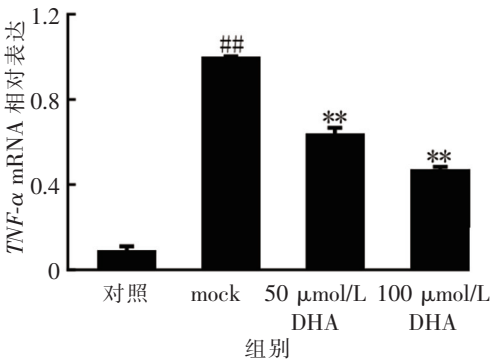


注：对照为不做任何处理；mock 为 IgE/BSA 诱导的模型；与对照相比，## 表示差异极具有统计学意义；与 mock 相比，** 表示差异极具有统计学意义。

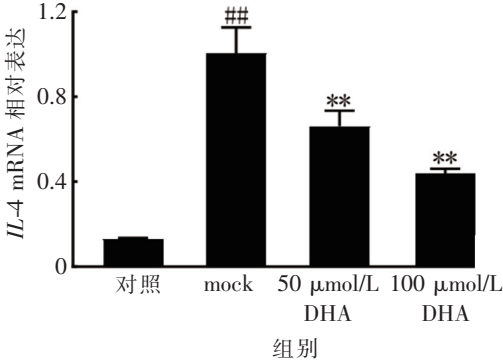
图 3 DHA 对 RBL-2H3 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响
Fig.3 Effect of DHA on calcium ion concentration in RBL-2H3 cells

2.4 DHA 抑制致敏 RBL-2H3 细胞中炎症因子的释放

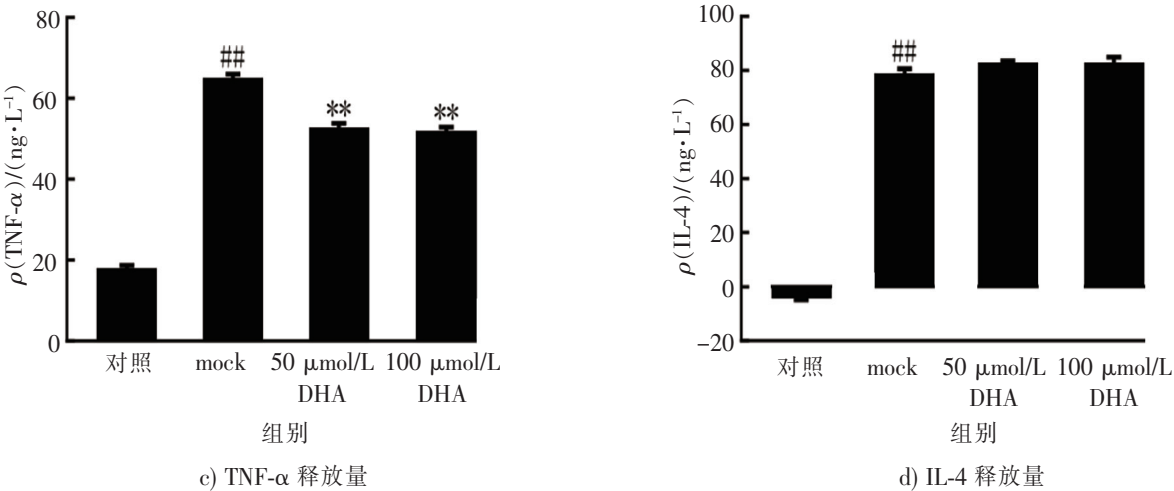
IL-4 和 TNF- α 都是 RBL-2H3 细胞敏化脱颗粒释放的炎症因子。在过敏反应后期常常伴随着 TNF- α 和 IL-4 的释放，它们在 I 型过敏反应中起着重要作用。IL-4 可以刺激 B 细胞分化，产生记忆细胞和浆细胞，促进 IgE 与 Fc ϵ RI 结合^[21]。研究表明，增强 IL-4 的组织效应，诱导血管内皮细胞表达黏附分子的表达可促进炎症细胞的聚集，并可促进嗜酸粒细胞、中性粒细胞释放白三烯等因子，从而导致过敏性疾病^[22]。而 TNF- α 可激活 T 细胞分泌多种炎症细胞因子。本研究进一步采用 qRT-PCR 法、ELISA 法测定细胞因子 mRNA 水平和释放量的变化，结果如图 4 所示。可见，与阴性对照相比，IgE/BSA 刺激后细胞的 TNF- α 和 IL-4 mRNA 水平显著上升 ($P < 0.01$)，且进一步用 DHA 处理后，TNF- α 和 IL-4 的 mRNA 的表达水平均呈浓度依赖性显著下降 ($P < 0.01$)；敏化细胞释放的 TNF- α 和 IL-4 量显著上升 ($P < 0.01$)，同时加入 DHA 处理后，细胞释放的 TNF- α 量显著下降，但 IL-4 释放量无显著变化。综上，DHA 能降低过敏反应过程中细胞炎症因子 IL-4、TNF- α 基因的表达及 TNF- α 的释放，但对 IL-4 的释放无影响，即 DHA 对炎症因子的表达与释放有一定的抑制作用。



a) TNF- α 基因表达



b) IL-4 基因表达

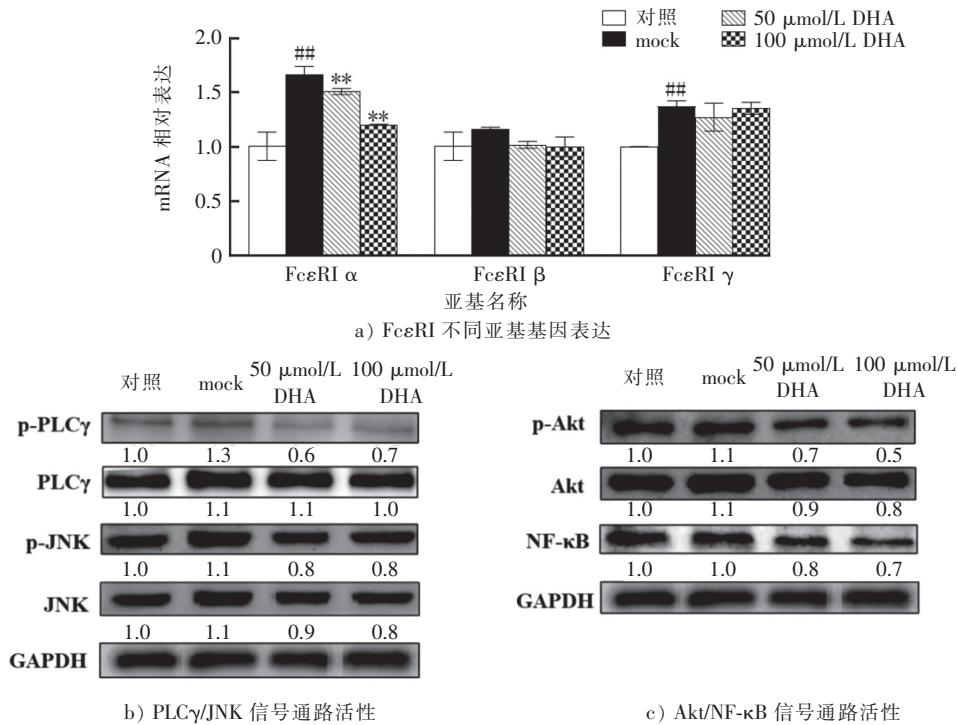


注:对照为不做任何处理; mock 为 IgE/BSA 诱导的模型; 与对照相比, ## 表示差异极具有统计学意义; 与 mock 相比, ** 表示差异极具有统计学意义。

图4 DHA对RBL-2H3细胞炎症因子的影响
Fig.4 Effect of DHA on the inflammatory factors in RBL-2H3 cells

2.5 DHA对过敏反应信号通路的影响

RBL-2H3 细胞表面的高亲和受体 FcεRI 与抗原、IgE 复合物交联后最终导致细胞脱颗粒。FcεRI 受体包含 α 亚基、β 亚基和 γ 亚基等 3 个亚基, 其中 α 亚基与 IgE 特异性结合, β 亚基、γ 亚基则实施信号调节和信号传导功能^[23]。为探究 DHA 是否调节 FcεRI 的表达, 本研究采用 qRT-PCR 法测定 FcεRI 各亚基的 mRNA 水平, 结果如图 5a 所示。可见, 与对照组相比, 敏化细胞的 FcεRI α 和 FcεRI γ 亚基的 mRNA 水平均显著上升 ($P < 0.01$), 而 FcεRI β 亚基表达无显著变化; 经 DHA 处理后, FcεRI α 亚基表达显著下降 ($P < 0.01$), 而 FcεRI β 和 FcεRI γ 亚基表达无显著变化。FcεRI 被激活后会招募 Lyn 使 FcεRI γ 亚基磷酸化, 并将磷酸化信号往下游传导。PLCγ/JNK 和 Akt/NF-κB 是 FcεRI 激活后下游的关键信号通路。PLCγ 被磷酸化激活后会刺激内质网上的三磷酸肌醇受体, 促使内质网释放 Ca²⁺。这时内质网因缺失 Ca²⁺ 会刺激细胞外 Ca²⁺ 内流, 激活 JNK 参与炎症反应并导致 RBL-2H3 细胞脱颗粒。Akt 被磷酸化激活后会刺激 NF-κB 的活性, 进而促进细胞核内炎症因子的转录, 最终导致 RBL-2H3 细胞脱颗粒。本研究进一步采用蛋白质免疫印迹法测定 PLCγ/JNK 和 Akt/NF-κB 两条信号通路的活性, 结果如图 5b、图 5c 所示。可见, 与对照组相比, IgE 敏化的细胞中 PLCγ 和 JNK 蛋白质的活性显著上升, 而 DHA 处理后 p-PLCγ、p-JNK 的蛋白质活性显著下降, 即 DHA 降低磷酸化 PLCγ 和 JNK 的活性, 但对其总蛋白质水平无显著影响。同样, 敏化细胞的 p-Akt 和 NF-κB 蛋白质水平显著上升, 但 DHA 处理后 p-Akt 和 NF-κB 蛋白质的水平则显著下降, 且 Akt 总蛋白质的水平无显著变化。综上所述, DHA 降低了 FcεRI 高亲和力受体介导的 PLCγ/JNK 和 Akt/NF-κB 信号通路的活性, 最终抑制 IgE/BSA 诱导的 RBL-2H3 细胞过敏反应。



注：以 GAPDH 为内参，设对照组蛋白质相对表达水平为 1.0；对照组为不做任何处理；mock 为 IgE/BSA 诱导的模型；与对照相比，## 表示差异极具有统计学意义；与 mock 相比，** 表示差异极具有统计学意义。

图 5 DHA 对敏化 RBL-2H3 细胞信号通路的影响

Fig.5 Effect of DHA on the signal pathway in sensitized RBL-2H3 cells

3 讨论

DHA 和 EPA 是常见的 ω -3 长链多不饱和脂肪酸。研究表明，给卵白蛋白诱导的食物过敏小鼠补充富含多不饱和脂肪酸的鱼油，可以降低其血清中的抗卵白蛋白 IgE 水平，抑制小肠炎症反应^[24]。多不饱和脂肪酸可以抑制一些与过敏性炎症相关的过程^[25]，但它们对肥大细胞的直接调节作用尚不明确。RBL-2H3 细胞与肥大细胞具有相似的特性，包括表达 IgE 高亲和力受体 FcεRI、释放组胺及分泌多种炎症介质等。因此，RBL-2H3 经常被用于模拟肥大细胞的体外过敏反应实验^[4]。本研究利用 RBL-2H3 细胞模型探究 DHA 对 IgE 介导的过敏反应的影响及可能的机制。

当肥大细胞发生敏化反应时，它会释放组胺、 β -氨基己糖苷酶和各种炎症因子，它的致敏还会引起细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加。因此，这些因子成为肥大细胞活化的标志物，也是引起机体过敏的主要介质^[26]。组胺平时储存在效应细胞内，细胞活化后会释放到胞外，引起血管平滑肌扩张和通透性增加，造成炎症和肿胀^[27]。 β -氨基己糖苷酶是一种参与细胞内容酶体分解的酶，是细胞脱颗粒的主要标记物^[28]。 Ca^{2+} 参与细胞的稳态维持及多种疾病的调控，在效应细胞脱颗粒时其浓度升高，它与分泌颗粒表面的融合蛋白结合，促进分泌颗粒与细胞膜的融合，触发效应细胞脱颗粒^[29]。肥大细胞本身可以产生和分泌促炎因子 IL-4、TNF- α 。IL-4 通过促进 IgE 的生成和效应细胞的活化，参与疾病的发生和发展。TNF- α 则广泛参与多种生理和病理过程，它也可以直接作用于肥大细胞，通过其受体激活

细胞内信号传导, 进一步促进细胞活化^[30]。本研究发现, IgE 介导的 RBL-2H3 细胞用 50、100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 作用后, 组胺和 β -氨基己糖苷酶的合成、分泌和细胞内 Ca^{2+} 浓度显著降低, 且 $\text{TNF-}\alpha$ 的分泌量也显著降低。因此, DHA 具有抗过敏活性, 可以抑制 IgE 介导的 RBL-2H3 细胞过敏反应。值得注意的是, DHA 对 IL-4 的分泌无显著影响, 具体原因还不清楚。有研究发现, 蛋白质表达的变化幅度通常小于 mRNA, 这种现象被称为“缓冲效应”^[31]。这表明, 在某些情况下, 尽管 mRNA 水平发生了变化, 但由于转录后调控等因素的作用, 蛋白质水平可能不会发生相应的变化。

$\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 是一个重要的膜受体, 主要在肥大细胞和嗜碱性粒细胞上表达。它是一种多聚体复合物, 通常由 1 个 α 、1 个 β 和 2 个二硫键连接的 γ 亚基组成, 参与 IgE 介导的敏化信号调节和信号传导^[32]。其中, α 亚基在细胞膜外, β 亚基和 γ 亚基则在细胞膜内。IgE-过敏原复合物与 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 交联后, 促使 α 亚基表达增加, β 亚基和 γ 亚基发生磷酸化修饰, 但蛋白质总量没变, 效应细胞在信号传导中被激活, 进而发生细胞脱颗粒现象。目前, 阻断 IgE- $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 相互作用是一种潜在的过敏治疗策略, 其中, $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 随着过敏原和 IgE 的性质而动态变化, 调控肥大细胞的不同信号通路功能。细胞即使在较弱或简单的过敏原刺激之后也可能存在互补机制, 使 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 对不同过敏原刺激强度和 IgE 含量作出适当的反应。利用 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 的这一特性可以改进 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 靶向治疗, 特别是利用 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 脱敏或抗原特异性免疫治疗过敏^[33]。

在过敏等免疫反应过程中, 磷酸化是调节细胞信号传导的一种重要机制, 涉及多种信号分子, 包括 $\text{PLC}\gamma$ 、Akt 和 JNK 等^[34]。当 IgE 抗体与 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 结合后, $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 受体会聚集并激活下游信号通路。与受体相关的酪氨酸激酶被激活后会进一步磷酸化并激活 $\text{PLC}\gamma$, 活化 $\text{PLC}\gamma$ 催化磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸转化为二酸甘油酯和肌醇三磷酸, 二酸甘油酯促进蛋白激酶 C 的活性, 而肌醇三磷酸引发细胞内 Ca^{2+} 的释放, 从而激活下游信号通路^[35]。Akt 是一个重要的生存信号传导分子, 能够促进细胞存活和增殖。在 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 信号传导下, Akt 可以被磷脂酰肌醇-3 激酶激活, 引起包括抑制细胞凋亡、促进细胞生长和代谢变化等多个生物学效应^[36]。在 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 信号传导过程中, JNK 可以通过多种途径被激活。JNK 是 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶) 通路的一部分, 参与应激反应、细胞增殖和凋亡^[37]。JNK 的激活通常与细胞应答、炎症反应和细胞凋亡有关。

$\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 的信号传导涉及复杂的磷酸化过程, $\text{PLC}\gamma$ 、Akt 和 JNK 在这一过程中发挥着重要作用。它们通过不同的信号通路相互交织, 最终影响细胞的生存、增殖和功能, 也对过敏反应和免疫系统起调节作用。这些信号通路的异常可能会导致过敏性疾病和其他免疫相关的疾病。

4 结论

本研究结果表明, DHA 可能通过抑制 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 的表达及其与 IgE 的结合, 降低 $\text{PLC}\gamma$ /JNK 和 Akt/NF- κB 信号通路的活性, 最终降低 IgE 引发的过敏反应。这为解析 IgE 介导的食物过敏等变态反应的调控机制提供了依据, 也为 DHA 等海洋天然活性物质在预防和缓解过敏等免疫疾病的应用提供了新的方向。但是, DHA 调控 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha$ 的作用机

制, 以及 DHA 是否通过参与细胞脂筏的形成调节 FcεRI 受体亚基的功能还有待进一步研究, DHA 在体内对过敏疾病的调节活性也有待深入探讨。

[参 考 文 献]

- [1] YANG H, QU Y Z, GAO Y R, et al. Role of the dietary components in food allergy: a comprehensive review[J]. Food Chemistry, 2022, 386: 132762. DOI: 10. 1016/j. foodchem. 2022. 132762.
- [2] CHEN M Y, SU Q, SHI Y G. Molecular mechanism of IgE-mediated FcεRI activation[J]. Nature, 2025, 637 (8045) : 453-460. DOI: 10. 1038/s41586-024-08229-8.
- [3] FAN J L, MA L P, XIE B L, et al. Modulating endoplasmic reticulum stress attenuates mast cell degranulation[J]. International Immunopharmacology, 2024, 126: 111336. DOI: 10. 1016/j. intimp. 2023. 111336.
- [4] RANA T S, BANSODE R R, WILLIAMS L L. Anti-allergic and anti-inflammatory signaling mechanisms of natural compounds/extracts in *in vitro* system of RBL-2H3 cell: a systematic review[J]. Cells, 2024, 13 (16) : 1389. DOI: 10. 3390/cells13161389.
- [5] BARSUMIAN E L, ISERSKY C, PETRINO M G, et al. IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones[J]. European Journal of Immunology, 1981, 11 (4) : 317-323. DOI: 10. 1002/eji. 1830110410.
- [6] MUKAI K, TSAI M, SAITO H, et al. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors[J]. Immunological Reviews, 2018, 282 (1) : 121-150. DOI: 10. 1111/imr. 12634.
- [7] LÜ W W, XU D X. Docosahexaenoic acid delivery systems, bioavailability, functionality, and applications: a review[J]. Foods, 2022, 11 (17) : 2685. DOI: 10. 3390/foods11172685.
- [8] BANTUGAN M A, XIAN H, SOLOMON V, et al. Associations of ApoE4 status and DHA supplementation on plasma and CSF lipid profiles and entorhinal cortex thickness[J]. Journal of Lipid Research, 2023, 64 (6) : 100354. DOI: 10. 1016/j. jlr. 2023. 100354.
- [9] WEN Y Q, XUE C H, ZHANG H W, et al. Concomitant oxidation of fatty acids other than DHA and EPA plays a role in the characteristic off-odor of fish oil[J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134724. DOI: 10. 1016/j. foodchem. 2022. 134724.
- [10] WANG T, LUO R T, LI W, et al. Dihydroartemisinin suppresses bladder cancer cell invasion and migration by regulating KDM3A and p21[J]. Journal of Cancer, 2020, 11 (5) : 1115-1124. DOI: 10. 7150/jca. 36174.
- [11] KOUTSALIARIS I K, PANTAZI D, TSOUKA A N, et al. Differential effect of omega-3 fatty acids on platelet inhibition by antiplatelet drugs *in vitro* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25 (18) : 10136. DOI: 10. 3390/ijms251810136.
- [12] HUA H, WU M Q, WU T, et al. Reduction of NADPH oxidase 4 in adipocytes contributes to the anti-obesity effect of dihydroartemisinin[J]. Heliyon, 2023, 9 (3) : e14028. DOI: 10. 1016/j. heliyon. 2023. e14028.
- [13] YANG F, ZHANG X, XIE Y H, et al. The pathogenesis of food allergy and protection offered by dietary compounds from the perspective of epigenetics[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2024, 128: 109593. DOI: 10. 1016/j. jnubio. 2024. 109593.
- [14] HOPPENBROUWERS T, FOGLIANO V, GARSSSEN J, et al. Specific polyunsaturated fatty acids can modulate *in vitro* human mDC2s and subsequent Th2 cytokine release[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 748. DOI: 10. 3389/fimmu. 2020. 00748.
- [15] JANSSEN H, WAGNER N M, NAPP L C, et al. Targeting innate and adaptive immunity for improvement of cardiovascular disease[J]. Frontiers in Physiology, 2022, 13: 952837. DOI: 10. 3389/fphys. 2022. 952837.
- [16] NUYTTENS L, DE VLIETGER L, DIELS M, et al. The clinical and immunological basis of early food introduction in food allergy prevention[J]. Frontiers in Allergy, 2023, 4: 1111687. DOI: 10. 3389/falgy. 2023. 1111687.
- [17] JIANG D L, JI J, AN L, et al. Mast cell-based electrochemical biosensor for quantification of the major shrimp allergen Pen a

- 1 (tropomyosin)[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 50: 150-156. DOI: 10.1016/j.bios.2013.06.032.
- [18] MA C H, MA Z Q, FU Q, et al. Curcumin attenuates allergic airway inflammation by regulation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells (Tregs)/Th17 balance in ovalbumin-sensitized mice[J]. *Fitoterapia*, 2013, 87: 57-64. DOI: 10.1016/j.fitote.2013.02.014.
- [19] 王博. 黄酮类化合物体外抗过敏活性筛选及人参黄酮分离纯化研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [20] ONISHI S, NISHI K, YASUNAGA S, et al. Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, exerts anti-allergic effect by suppressing activation of phosphoinositide 3-kinase[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 6: 606-614.
- [21] ZHONG H, LI J, CHENG J H. Targeting different signaling pathways for food allergy regulation and potential therapy: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(33): 12860-12877. DOI: 10.1080/10408398.2023.2257798.
- [22] KERLEY C P. Dietary patterns and components to prevent and treat heart failure: a comprehensive review of human studies[J]. *Nutrition Research Reviews*, 2019, 32(1): 1-27. DOI: 10.1017/S0954422418000148.
- [23] ARTHUR G K, CRUSE G. Regulation of trafficking and signaling of the high affinity IgE receptor by FcεRIβ and the potential impact of FcεRIβ splicing in allergic inflammation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2): 788.
- [24] DE MATOS O G, AMARAL S S, PEREIRA DA SILVA P E M, et al. Dietary supplementation with omega-3-PUFA-rich fish oil reduces signs of food allergy in ovalbumin-sensitized mice[J]. *Journal of Immunology Research*, 2012, 2012(1): 236564.
- [25] SARTORIO M U A, PENDEZZA E, COPPOLA S, et al. Potential role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in pediatric food allergy[J]. *Nutrients*, 2021, 14(1): 152. DOI: 10.3390/nu14010152.
- [26] VOELKER D, PONGDEE T. Urine mast cell mediators in the evaluation and diagnosis of mast cell activation syndrome[J]. *Current Allergy and Asthma Reports*, 2024, 24(2): 33-38. DOI: 10.1007/s11882-024-01128-y.
- [27] FALKENSTEIN M, ELEK M, STARK H. Chemical probes for histamine receptor subtypes[J]. *Current Topics in Behavioral Neuroscience*, 2022, 59: 29-76. DOI: 10.1007/7854_2021_254. 34595743.
- [28] LI G X, WU H Y, SUN L Q, et al. (-)-α-Bisabolol alleviates atopic dermatitis by inhibiting MAPK and NF-κB signaling in mast cell[J]. *Molecules*, 2022, 27(13): 3985. DOI: 10.3390/molecules27133985.
- [29] QI R, KANG Y, LI X, et al. Forsythiasides-rich extract from forsythiae fructus inhibits mast cell degranulation by enhancing mitochondrial Ca²⁺ uptake[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 696729. DOI: 10.3389/fphar.2021.696729.
- [30] WU T Q, HE J L, YAN S R, et al. Human placental extract suppresses mast cell activation and induces mast cell apoptosis[J]. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2023, 19(1): 98. DOI: 10.1186/s13223-023-00850-y.
- [31] PERL K, USHAKOV K, POZNIAK Y, et al. Reduced changes in protein compared to mRNA levels across non-proliferating tissues[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 305. DOI: 10.1186/s12864-017-3683-9.
- [32] VITTE J, VIBHUSHAN S, BRATTI M, et al. Allergy, anaphylaxis, and nonallergic hypersensitivity: IgE, mast cells, and beyond[J]. *Medical Principles and Practice*, 2022, 31(6): 501-515. DOI: 10.1159/000527481.
- [33] NAGATA Y, SUZUKI R. FcεRI: A master regulator of mast cell functions[J]. *Cells*, 2022, 11(4): 622.
- [34] WAUDBY C A, ALVAREZ-TEIJEIRO S, JOSUE RUIZ E, et al. An intrinsic temporal order of c-JUN N-terminal phosphorylation regulates its activity by orchestrating co-factor recruitment[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6133.
- [35] SJÖBERG E, MELSEN M, RICHARDS M, et al. Endothelial VEGFR2-PLCγ signaling regulates vascular permeability and antitumor immunity through eNOS/Src[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2023, 133(20): e161366.
- [36] LI X Q, LU Y, JIN W D, et al. Autophosphorylation of Akt at threonine 72 and serine 246: a potential mechanism of regulation of Akt kinase activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(19): 13837-13843.
- [37] ZHANG W Q, SUN H Y, ZHAO W X, et al. Suppression of JNK pathway protects neurons from oxidative injury via attenuating parthanatos in glutamate-treated HT22 neurons[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 25793.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)