

EPA 和 DHA 对断奶仔猪淋巴细胞转化和细胞内信号分子的影响

刘玉兰^{1, 2}, 李德发^{1, 2*}, 龚利敏^{1, 2}, 冯占雨^{1, 2}, 赵丽丹^{1, 2}

(1. 中国农业大学国家饲料工程技术研究中心, 北京 100094; 2. 动物营养学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 研究二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)对断奶仔猪外周血淋巴细胞转化及相关细胞内信号分子的影响。结果表明:(1)EPA 和 DHA 剂量依赖性地抑制淋巴细胞转化($P < 0.05$);(2)EPA 和 DHA 剂量依赖性地刺激一氧化氮($P < 0.001$)、环腺苷酸($P < 0.001$)和环鸟苷酸($P < 0.001$)的产生,提高环腺苷酸/环鸟苷酸比例($P < 0.05$);(3)EPA 和 DHA 使细胞内游离 Ca^{2+} 浓度出现瞬间上升,其上升幅度有明显的剂量依赖关系;(4)EPA 和 DHA 剂量依赖性地抑制蛋白激酶 C 活性($P < 0.05$),而对蛋白激酶 A 活性无影响。EPA 和 DHA 抑制仔猪淋巴细胞功能,其作用可能是通过改变细胞内信号转导实现的。

关键词: 断奶仔猪;二十碳五烯酸;二十二碳六烯酸;淋巴细胞转化;信号转导

中图分类号:S852.4

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2007)10-1060-06

Effect of EPA and DHA on Lymphocyte Proliferation and Intracellular Signaling Molecules in Weanling Pigs

LIU Yu-lan^{1, 2}, LI De-fa^{1, 2*}, GONG Li-min^{1, 2},

FENG Zhan-yu^{1, 2}, ZHAO Li-dan^{1, 2}

(1. National Feed Engineering Technology Research Center, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Beijing 100094, China)

Abstract: The experiment was conducted to investigate the effect of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) on peripheral blood lymphocyte proliferation and intracellular signaling molecules in weanling pigs. The results showed that EPA and DHA inhibited lymphocyte proliferation ($P < 0.05$) and stimulated nitric oxide (NO) ($P < 0.001$), cAMP ($P < 0.001$) and cGMP ($P < 0.001$) production and cAMP/ cGMP ratio in a dose-dependent manner. EPA and DHA induced a momentary rise of intracellular Ca^{2+} , and the rising extent was dependent on the concentration of EPA and DHA. EPA and DHA also inhibited protein kinase C activity in a dose-dependent manner ($P < 0.05$), and had no effect on protein kinase A activity. These results suggested that EPA and DHA exert an inhibitory effect on lymphocyte function, possibly due to alteration of intracellular signal transduction.

Key words: weanling pigs; eicosapentaenoic acid; docosahexaenoic acid; lymphocyte proliferation; signal transduction

收稿日期:2006-08-28

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2004 CB 117503);国家自然科学基金创新研究群体(30121004)

作者简介:刘玉兰(1975-),女,湖北人,博士,副教授,主要从事猪营养与免疫方面的研究, Tel: 027-83956175, E-mail: yulanflower@126.com

* 通讯作者:李德发,教授,博士生导师, Tel: 010-62733590, E-mail: defali@public2.bta.net.cn

深海鱼油富含 n-3 多不饱和脂肪酸,尤其是 EPA 和 DHA。许多动物疾病模型和人类临床试验已证明鱼油具有重要的免疫调节作用和抗炎作用^[1~6]。鱼油的免疫调节作用主要是通过 EPA 和 DHA 实现的^[3, 7]。目前,有关鱼油对免疫功能调节作用的研究主要集中于实验动物和人上,而在畜禽方面的研究鲜见报道,有关其免疫调节机理尤其是对免疫细胞信号转导过程的影响也未见报道。本试验运用体外淋巴细胞培养模型,研究 EPA 或 DHA 对断奶仔猪淋巴细胞功能的影响,并从细胞信号转导角度探讨其作用机制,为鱼油在畜牧生产中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

EPA、DHA、Hepes、刀豆蛋白 A(Con A)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、EGTA、佛波醇酯(PMA)、牛血清白蛋白、抽提缓冲液(含 20 mmol/L Tris-HCl、0.5 mmol/L EDTA、0.5 mmol/L EGTA、0.5 mmol/L Triton X-100、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑肽酶和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亮肽素)均为 Sigma 产品;RPMI-1640 培养基为 Hyclone 产品;钙离子荧光指示剂(Fura-2/AM)为 Biotium 公司产品;淋巴细胞分层液为中国医学科学院天津血液研究所产品;小牛血清为联星生物技术公司产品;台盼蓝、十二烷基硫酸钠(SDS)、Greiss 试剂(含 1%对氨基苯磺酸、0.1% N-1-萘乙二胺盐酸盐、2.5%磷酸)、Triton X-100 均为国产试剂。

cAMP、cGMP 试剂盒为上海中医药大学同位素研究室产品;蛋白激酶 C(PKC)、蛋白激酶 A(PKA)试剂盒为 Exalpa Biologicals, Inc. USA 产品;荧光分光光度计为日本 Hipachi 产品。

1.2 淋巴细胞分离

淋巴细胞来源于 28 d 断奶仔猪,体重 7.5 kg,健康状况良好。从仔猪前腔静脉用肝素抗凝真空管采血。取 10 mL 离心管加淋巴细胞分层液 4 mL,然后沿管壁缓缓叠加 2 mL 血,2 500 r/min 离心 30 min,取中间白细胞部分,用 3~5 倍体积无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hank's 液洗 3 次,每次 2 000 r/min 离心 10 min。然后将细胞悬浮于 RPMI-1640 完全培养液,用台盼蓝染色,计数活细胞数(>95%),调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 。

1.3 淋巴细胞转化率的测定

将细胞悬液加入 96 孔培养板中,加入不同浓度的 EPA 或 DHA(0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),然后用 RPMI-1640 完全培养液将每孔调整到 200 μL 。置 5% CO_2 ,37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 后,加入 Con A(终浓度为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$),继续培养 48 h。培养结束前 6 h,每孔加入 10 mL MTT(初始浓度为 5 mg/mL),继续培养。培养结束后,每孔加入 100 μL 10% SDS-0.04 mL/L HCl 溶液,继续培养 2 h,使紫色结晶完全溶解,用酶联免疫检测仪测定 OD₅₇₀ 值。

1.4 一氧化氮的测定

将细胞悬液加入 96 孔培养板中,然后加入不同浓度的 EPA 或 DHA(0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),培养体系体积为每孔 200 μL 。培养 24 h 后,加入 Con A(终浓度为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$),置 5% CO_2 ,37 $^\circ\text{C}$ 继续培养 24 h 后测定上清液中 NO 含量。即取 100 μL 上清液加入等体积 Greiss 试剂,室温反应 20 min,在酶联免疫仪上测定 OD₅₅₀ 值。同时制作标准曲线。

1.5 环腺苷酸和环鸟苷酸的测定

将细胞悬液加入到 48 孔细胞培养板,然后加入不同浓度的 EPA 或 DHA(0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),培养体系体积为每孔 500 μL 。培养 24 h 后,加入 Con A(终浓度为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$),继续培养 20 min 后,置冰浴中超声处理 20 min,3 000 r/min 离心 15 min,上清液在 70~75 $^\circ\text{C}$ 水浴蒸干,测定时干渣溶于适量的醋酸缓冲液(pH4.5)中。cAMP、cGMP 用相应的试剂盒测定。

1.6 细胞钙的测定

细胞钙测定采用钙离子荧光指示剂 Fura-2/AM 法,用 F-4500 荧光分光光度计测定。Fura-2/AM 负载:用含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hanks 液悬浮细胞,细胞悬液($1 \times 10^6/\text{mL}$)于 37 $^\circ\text{C}$ 预温 10 min 后,加入 Fura-2/AM(终浓度为 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$),37 $^\circ\text{C}$ 恒温振荡 45 min,用含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hanks 液 2 000 r/min 离心 10 min 洗涤 3 次,再悬浮于等体积分含 0.1%牛血清白蛋白的含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hanks 液中。将 1 mL 细胞悬液置于石英杯中,石英杯底置一小的磁力搅拌器,用 F-4500 荧光分光光度计扫描测定。测定条件:狭缝宽度均为 10 nm,激发波长为 340 nm 和 380 nm,发射波长为 510 nm。测定时细胞悬液温度保持在 37 $^\circ\text{C}$,磁力搅拌器保持搅拌。依次测定静息时、加入不同浓度 EPA 或 DHA(0、20、40、80

$\mu\text{g/mL}$)后的荧光强度及最大(加入终浓度为 0.1% 的 Triton-X-100 时)和最小(加入终浓度为 5 mmol/L 的 EGTA 时)的荧光强度。根据下列公式计算出细胞游离 Ca^{2+} 浓度:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \times (F_{\min} / F_{\max})$$

式中, $K_d = 224 \text{ nmol/L}$; R 等于 340 nm 的荧光强度与 380 nm 的荧光强度的比值, 其中 R_{\max} 和 R_{\min} 为测得的最大和最小的荧光比值; F_{\max} 和 F_{\min} 分别为最大和最小荧光强度, 即在细胞外液钙离子浓度大于 1 mmol/L 情况下分别加入终浓度为 0.1% Triton X-100 和 5 mmol/L EGTA (pH > 8.5) 后所测得的 380 nm 的荧光强度。

1.7 PKC 和 PKA 活性的测定

将细胞悬液加入到 6 孔细胞培养板, 然后加入不同浓度的 EPA 或 DHA (0、40、80 $\mu\text{g/mL}$), 培养 24 h 后, 加入 PMA (终浓度为 200 nmol/L), 继续培养 30 min。用 PBS (pH 7.4) 洗细胞 2 次, 完全倾去洗液, 然后用 500 μL 的抽提缓冲液重悬细胞, 冰浴超声粉碎 5 次, 每次 10 s, 间隔时间为 10 s, 冰浴 30 min, 2 000 r/min 离心 2 min, 收集上清液, 用 PKC 和 PKA 试剂盒测定 PKC 和 PKA 的活性。

1.8 数据统计

数据用 SPSS 6.0 的 GLM 程序进行单因素方差分析和邓肯氏多重比较。以 $P < 0.05$ 为显著性标准。 Ca^{2+} 的动力学曲线采用 Microcal Origin 6.0 (Microcal software, Inc. One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) 制作。

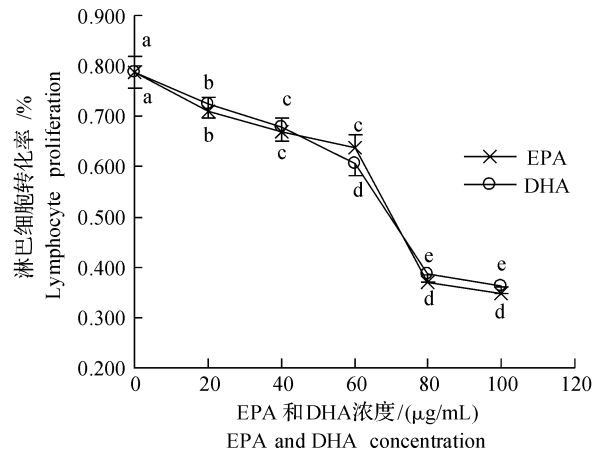
2 结果与分析

2.1 EPA 和 DHA 对淋巴细胞转化率的影响

EPA 和 DHA 对外周血淋巴细胞转化率的影响见图 1。EPA 和 DHA 剂量依赖性地抑制仔猪外周血淋巴细胞转化率 ($P < 0.05$)。当 EPA 和 DHA 浓度达到 20 $\mu\text{g/mL}$ 时对淋巴细胞转化的抑制达到显著水平 ($P < 0.05$)。

2.2 EPA 和 DHA 对细胞信号分子的影响

EPA 和 DHA 对外周血淋巴细胞 NO、cAMP 和 cGMP 产生以及 cAMP/cGMP 比例的影响见图 2、3、4 和 5。EPA 和 DHA 剂量依赖性地刺激外周血淋巴细胞 NO、cAMP 和 cGMP 的产生 ($P < 0.001$)。当 EPA 和 DHA 的浓度分别达到 60 和 80 $\mu\text{g/mL}$ 时对 NO 和 cAMP 的刺激作用达到显著水



数据表示为平均数 \pm 标准差。^{a~e}。同一线上数据点肩标无相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下图同 Data are expressed as mean \pm SD. ^{a~e}. Within a line, means that do not have a common superscript or subscript differ ($P < 0.05$). The same in the following figures

图 1 EPA 和 DHA 对仔猪外周血淋巴细胞转化率的影响

Fig. 1 Effects of EPA and DHA on peripheral blood lymphocyte proliferation in weanling pigs

平 ($P < 0.05$)。当 EPA 和 DHA 的浓度达到 60 $\mu\text{g/mL}$ 时对 cGMP 的刺激作用达到显著水平 ($P < 0.05$)。当 EPA 和 DHA 的浓度达到 80 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 时对 cAMP/cGMP 的比例的提高达到显著水平 ($P < 0.05$)。

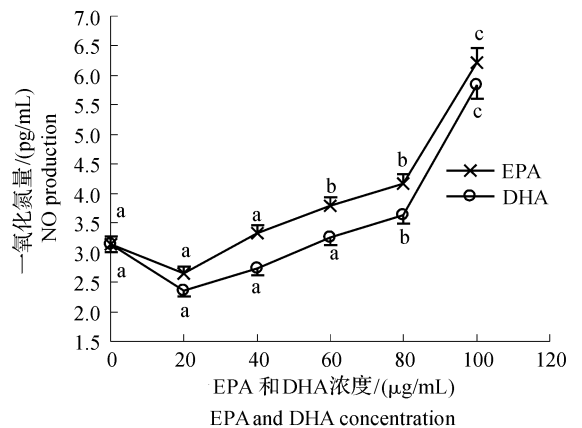


图 2 EPA 和 DHA 对仔猪外周血淋巴细胞 NO 产生的影响

Fig. 2 Effects of EPA and DHA on NO production of peripheral blood lymphocytes in weanling pigs

EPA 和 DHA 对仔猪外周血淋巴细胞 Ca^{2+} 浓度的动力学曲线的影响结果见图 6。当淋巴细胞悬

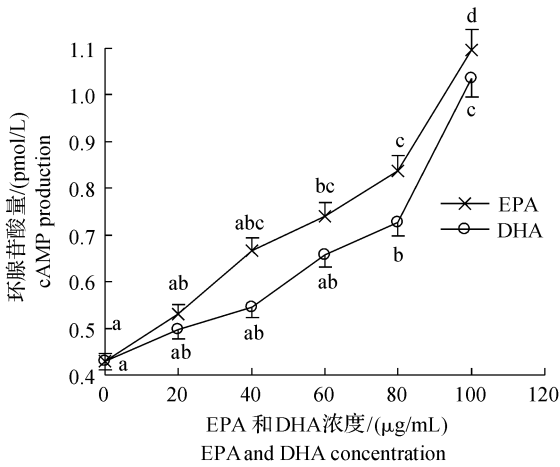


图 3 EPA 和 DHA 对仔猪外周血淋巴细胞 cAMP 产生的影响

Fig. 3 Effects of EPA and DHA on cAMP production of peripheral blood lymphocytes in weaning pigs

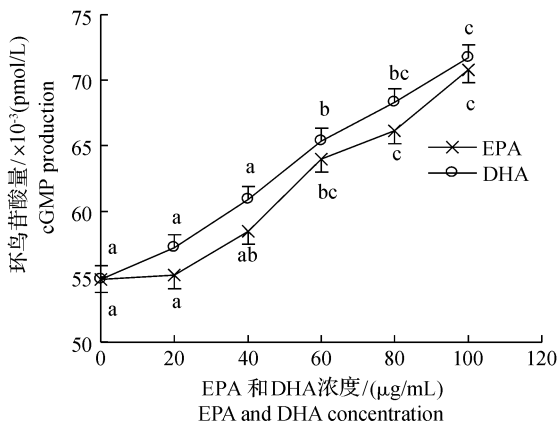


图 4 EPA 和 DHA 对仔猪外周血淋巴细胞 cGMP 产生的影响

Fig. 4 Effects of EPA and DHA on cGMP production of peripheral blood lymphocytes in weaning pigs

液中分别加入不同浓度的 EPA 和 DHA (20、40 和 80 µg/mL) 时, 细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 都出现瞬间上升, 其上升幅度有明显的剂量依赖关系, 随后以相对低的速度下降, 最后回到基础水平。

EPA 和 DHA 对外周血淋巴细胞 PKC 活性的影响结果见表 1 和 2。EPA 和 DHA 对 PKC 活性产生剂量依赖性的抑制作用 ($P < 0.05$)。当 EPA 和 DHA 浓度分别达到 40 和 80 µg/mL 时, 对 PKC 的活性的抑制作用达到显著水平 ($P < 0.05$)。EPA 和 DHA 对 PKA 活性无影响 ($P > 0.05$)。

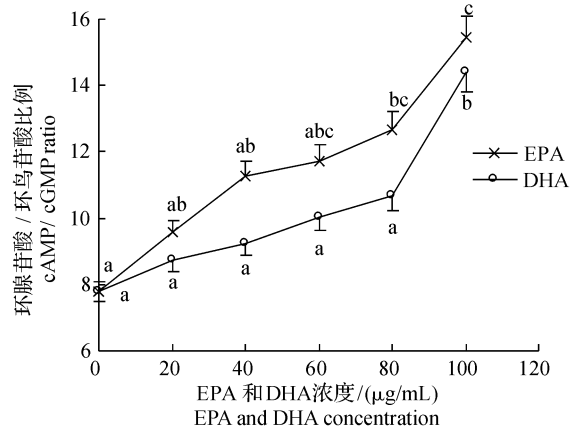
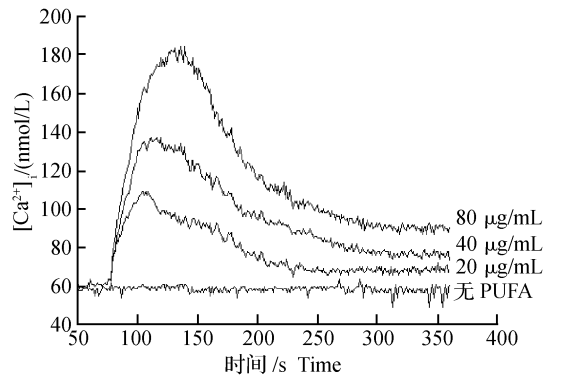


图 5 EPA 和 DHA 对仔猪外周血淋巴细胞 cAMP/cGMP 比值的影响

Fig. 5 Effects of EPA and DHA on cAMP/cGMP ratio of peripheral blood lymphocytes in weaning pigs



EPA 和 DHA 对细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响呈现出非常相似的动力学曲线, 本试验只列出 EPA 对 $[Ca^{2+}]_i$ 影响的动力学曲线, 作为两种脂肪酸的代表。 Ca^{2+} 的动力学曲线采用 Microcal Origin 6.0 (Microcal software, Inc. One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) 制作

EPA 和 DHA showed a very similar effect, so only the effect of EPA on $[Ca^{2+}]_i$ is presented as representative of EPA and DHA. The curve of $[Ca^{2+}]_i$ was made by using Microcal Origin 6.0 (Microcal software, Inc. One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA)

图 6 EPA 和 DHA 对仔猪外周血淋巴细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的动力学曲线的影响

Fig. 6 Effects of EPA and DHA on the kinetics of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ in peripheral blood lymphocytes in weaning pigs

3 讨论

3.1 EPA 和 DHA 对淋巴细胞转化率的影响

表 1 EPA 和 DHA 对仔猪外周血淋巴细胞蛋白激酶 C 活性的影响

Table 1 Effects of EPA and DHA on protein kinase C activity of peripheral blood lymphocytes in weanling pigs

蛋白激酶 C 活性/($\text{pmol}^{32}\text{P}/10^7$ 细胞) PKC activity	EPA 和 DHA 浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$) EPA and DHA concentration			SEM	P 值 P value
	0	40	80		
	EPA	8.07 ^a	5.88 ^b		
DHA	8.07 ^a	6.08 ^{ab}	5.11 ^b	0.95	0.021

^{a-c}. 同一行数据肩标无相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下表同

^{a-c}. Within a line, means that do not have a common superscript differ ($P < 0.05$); The same in the following table

表 2 EPA 和 DHA 对仔猪外周血淋巴细胞蛋白激酶 A 活性的影响

Table 2 Effects of EPA and DHA on protein kinase A activity of peripheral blood lymphocytes in weanling pigs

蛋白激酶 A 活性/($\text{pmol}^{32}\text{P}/10^7$ 细胞) PKA activity	EPA 和 DHA 浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$) EPA and DHA concentration			SEM	P 值 P value
	0	40	80		
	EPA	7.26	6.18		
DHA	7.26	6.38	6.14	1.25	0.524

淋巴细胞转化率是评价细胞免疫功能的一个重要指标, EPA 和 DHA 对淋巴细胞转化率的影响在实验动物和人上已有许多报道。绝大多数研究表明, EPA 和 DHA 在体内和体外均抑制淋巴细胞的转化^[1~6], 这与本试验的结果一致。

3.2 EPA 和 DHA 对细胞内信号分子的影响

NO 是具有广泛生物活性的信息分子, 在免疫调节中起重要作用: (1) NO 是 $M\phi$ 的效应分子。NO 由 $M\phi$ 产生, 能杀灭微生物和肿瘤细胞, 因此能增强机体非特异性免疫功能, 并且介导 $M\phi$ 的吞噬作用; (2) NO 抑制 T-淋巴细胞增殖^[8]; (3) NO 抑制细胞因子分泌^[9]。本试验中, EPA 和 DHA 抑制仔猪外周血淋巴细胞转化, 同时刺激 NO 的产生, 因此 EPA 和 DHA 可能是通过促进 NO 产生而抑制淋巴细胞转化。

cAMP/cGMP 是细胞内最早发现的第二信使系统, 对细胞功能具有重要调节作用。一般认为 cAMP 水平升高会抑制淋巴细胞的活化, 而大多数报道认为, cGMP 引起的生物效应常与 cAMP 相反, 当 cGMP 含量增加时, 促进细胞内核酸和组蛋白的合成, 提高细胞的增殖水平, 促进细胞的分裂。二者合适的比例对维持淋巴细胞功能具有重要作用。本试验中, EPA 和 DHA 抑制仔猪外周血淋巴细胞转化, 同时促进 cAMP 和 cGMP 的产生, 提高 cAMP/cGMP 的比例, 故 EPA 和 DHA 可能是通过促进 cAMP 的产生或提高 cAMP/cGMP 的比例而

抑制淋巴细胞转化。

NO 是鸟苷酸环化酶的强激活剂, NO 不但可使自身细胞内的 cGMP 浓度升高, 而且使临近细胞内 cGMP 浓度升高, 因此 NO 能通过 cGMP 信息系统发挥免疫调节作用^[10]。与此相似, 在本试验中, EPA 和 DHA 同时刺激 NO 和 cGMP 的产生, 因此, EPA 和 DHA 可能是通过刺激 NO 的产生而促进 cGMP 的生成。由于大多数报道认为 cGMP 能促进淋巴细胞增殖, 因此, 我们很难从 cGMP 角度解释 EPA 和 DHA 抑制淋巴细胞增殖的原因。但 Fischer 等^[11] 报道, 将人 T-细胞与 NO 供体或 cGMP 类似物共同孵育, 能激活 cGMP 依赖蛋白激酶, 抑制 IL-2 释放和细胞增殖, 而对缺乏 cGMP 依赖蛋白激酶的 T 细胞, 即使高浓度的 cGMP 也没有抑制作用, 因此 NO-cGMP-cGMP 依赖蛋白激酶信息传递途径对 T 细胞活化具有负调控作用。在本试验中, EPA 和 DHA 可能是通过 NO-cGMP-cGMP 依赖蛋白激酶信息传递途径抑制淋巴细胞增殖。然而, 由于我们没有测定 cGMP 依赖蛋白激酶的活性, 故该推测有待验证。

细胞内游离钙离子是一种重要的第二信使, 对细胞免疫功能起重要的调节作用。本试验中, EPA 和 DHA 使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬时升高, 由于 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高可促进淋巴细胞活化, 因此不能从细胞内游离 Ca^{2+} 的角度解释 EPA 和 DHA 对淋巴细胞增殖产生的抑制作用。但由于 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高是短暂的早期事件, 在

10~15 min 后即回到基础水平^[12], 而 T-淋巴细胞分化和增殖是晚期事件^[13]。因此本试验中 $[Ca^{2+}]$; 瞬时上升可能并未导致淋巴细胞增殖。

PKC 是一种磷脂依赖性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。目前发现, PKC 家族至少有 12 种同工型, 同时存在钙依赖性和非钙依赖性 PKC 的传导途径^[14]。总的来说, PKC 是一种促有丝分裂信号。Ca²⁺ 依赖性 PKC 的激活依赖于 Ca²⁺ 信号, 细胞内 Ca²⁺ 浓度的上升可激活 PKC, 而非 Ca²⁺ 依赖性 PKC 则不依赖于 Ca²⁺ 信号^[14]。在本试验中, EPA 和 DHA 使 $[Ca^{2+}]$; 瞬时升高, 而使 PKC 活性下降, 可能是 PKC 主要为非钙依赖性所致。PKC 激活既是淋巴细胞激活的早期事件也是晚期事件^[13], 可直接导致淋巴细胞增殖^[15]。Denys 等发现 EPA 和 DHA 显著降低 Jurkat T-细胞 PMA 诱导的 PKC 的活性^[16]。与此相似, 本试验中, EPA 和 DHA 抑制了 PKC 的活性, 这可解释为 EPA 和 DHA 对淋巴细胞增殖具有抑制作用。

与 PKC 的作用相反, PKA 是一种抑制有丝分裂的信号, cAMP 可通过激活 PKA 而抑制细胞增殖。本试验中, EPA 和 DHA 促进 cAMP 的产生, 而对 PKA 活性无影响, 因此可能 cAMP/PKA 系统具有不同步性, 对此还需进一步深入研究。

4 小 结

EPA 和 DHA 可能通过促进淋巴细胞 NO、cAMP 的产生, 提高 cAMP/cGMP 比例和抑制 PKC 的活性而抑制淋巴细胞转化。

参考文献:

- [1] Calder P C. The effect of dietary fatty acids on the immune response and susceptibility to infection [A]. In: Suskind R M and Tontisirin K ed. Nutrition, Immunity and Infection in Infants and Children [C]. Lippincott Wilkins and Williams, Philadelphia, 2001a. 137~172.
- [2] Calder P C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity [J]. *Lipids*, 2001b, 36:1 007~1 024.
- [3] Calder P C, Field C J. Fatty acids, inflammation and immunity [A]. In: Calder P C, Field C J and Gill H S ed. Nutrition and Immune Function [C]. CAB International, 2002, 57~92.
- [4] Yaqoob P. Fatty acids as gatekeepers of immune cell reg-

ulation [J]. *Trends Immunol*, 2004, 24: 639~645.

- [5] Yaqoob P. Lipids and the immune response from molecular mechanisms to clinical applications [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003, 6:133~150.
- [6] Nathalia P, Sandro B, Maressa P, *et al.* Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats [J]. *Nutrition*, 2006, 22:425~432.
- [7] McMurray D N, Jolly C A, Chapkin R S. Effects of dietary n-3 fatty acids on T cell activation and T cell receptor-mediated signaling in a murine model [J]. *J Infect Dis*, 2000, 182:S103~S107.
- [8] Bingisser R M, Tilbrook P A, Holt P G, *et al.* Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway [J]. *J Immunol*, 1998, 160: 5 729~5 734.
- [9] Bauer H, Jung T, Tsikas D, *et al.* Nitric oxide inhibits the secretion of T-helper 1- and T-helper 2-associated cytokines in activated human T cells [J]. *Immunology*, 1997, 90:205~211.
- [10] Ignarro L J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide [J]. *Biochem Pharmacol*, 1991, 41: 485~490.
- [11] Fischer T A, Palmetshofer A, Gambaryan S, *et al.* Activation of cGMP-dependent protein kinase I beta inhibits interleukin 2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 5 967~5 974.
- [12] Chow S C, Jondal M. Polyunsaturated free fatty acids stimulate an increase in cytosolic Ca²⁺ by mobilizing the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ pool in T-cells through a mechanism independent of phosphoinositide turnover [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265:902~907.
- [13] Ward G W. CD28: a signaling perspective [J]. *Biochem J*, 1996, 318:361~377.
- [14] Davidson L A, Jiang Y H, Derr J N, *et al.* Protein kinase C isoforms in human and rat colonic mucosa [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 312:547~553.
- [15] Szamel M, Resch K. T-cell antigen receptor-induced signal-transduction pathways—activation and function of protein kinases C in T lymphocytes [J]. *Eur J Biochem*, 1995, 228:1~15.
- [16] Denys A, Hichami A, Khan N A. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase (ERK1/ERK2) signaling in human T cells [J]. *J Lipid Res*, 2001, 42:2 015~2 020.