

κ -卡拉胶协同三硝基苯磺酸致鼠结肠炎症的研究

甄张赫, 吴 玮, 陈海敏*

(宁波大学 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为了研究 κ -卡拉胶(CGN)协同加强三硝基苯磺酸(TNBS)对 BALB/c 小鼠结肠炎症的作用, 利用 TNBS 诱导 BALB/c 小鼠结肠炎模型, 分析了 κ -卡拉胶处理后, 小鼠存活率及组织学变化, 随后应用表达谱芯片技术分析差异表达基因. 结果发现, κ -卡拉胶增加了 TNBS 诱导的小鼠死亡率及结肠损伤. 芯片数据发现: κ -卡拉胶协同 TNBS 处理后, 较之 TNBS 处理组出现 619 个变化基因, 部分炎症相关基因继续上调, 炎症应答程度出现增强. 而 κ -卡拉胶单独处理不具有致炎性, 仅影响代谢系统等相关基因的变化. 表明 κ -卡拉胶可通过增强上调炎症相关基因, 加重 TNBS 诱导小鼠结肠炎症反应.

关键词: κ -卡拉胶; 三硝基苯磺酸; 协同; 结肠炎

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2017) 05-0024-06

卡拉胶(CGN)是从红藻细胞壁中提取的高分子亲水性硫酸酯多糖, 基于其良好的增稠、乳化、稳定等特性, 被广泛应用于食品、日用化工和医药行业. 然而卡拉胶的安全性问题备受争议. 许多国际官方机构的报告认为卡拉胶对人体无毒副作用, 如美国食品和药物管理局(FDA)在 1991 年的报告中指出, 卡拉胶作为食品添加剂是安全的^[1-2]. 某些动物实验结果也得出卡拉胶无害的结论, 如 Weiner 等^[3]研究表明: 卡拉胶在不超过 5%的剂量下不会产生肠道溃疡. 而另一方面, 卡拉胶是医学和药理学研究中常用的致炎剂, 被广泛用于制备炎症模型以评估抗炎药物的活性及研究炎症机制^[4]. 许多动物和细胞水平的研究也发现卡拉胶会导致炎症, 诱发动物结肠性溃疡、肠道癌症等. 如 Tobacman 小组经大量研究报道了卡拉胶引起结肠上皮细胞炎症因子的爆发, 并探讨了其致炎机制^[5-7].

为探究卡拉胶的安全性, 我们进行了前期研究, 发现卡拉胶通过结肠上皮细胞的 toll-like receptor 4 (TLR4)增强脂多糖(LPS)诱导的 IL-8 分泌^[8], 且卡拉胶能与巨噬细胞互作, 放大结肠组织

的损伤^[9]. 因此其很可能是一种隐性的致炎物, 即当肠道处于“不健康”状态时, 如有轻微炎症时, 会增强炎症的发生.

本研究应用建立小鼠结肠炎克罗恩病(CD)模型的试剂三硝基苯磺酸(Trinitrobenzene Sulfonic Acid, TNBS), 诱导 BALB/c 小鼠的结肠炎症^[10], 观察 κ -卡拉胶对已有结肠炎症的小鼠增强致炎的效果, 以期获得 κ -卡拉胶致炎的机制.

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c 小鼠(SCXK 2012-0001, 北京维通利华实验动物科技有限公司), 6 周龄, 20~25 g, 饲养于宁波大学医学院实验动物中心的清洁级动物房(温度 20~25 °C, 相对湿度 60%~70%), 且通风良好, 自由饮水和进食, 每日 12 h 光照.

1.2 动物实验步骤

80 只小鼠共分为 8 组, 每个实验组雌雄各半. 空白组仅给予生理盐水; κ -卡拉胶组给予 8.3 mg·kg⁻¹ 的 κ -卡拉胶; TNBS 组给予 100 μ L 3%的

收稿日期: 2016-10-04.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journal.g.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(81370532).

第一作者: 甄张赫(1992-), 女, 辽宁盖平人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 海洋药理. E-mail: 791633187@qq.com

*通信作者: 陈海敏(1975-), 女, 浙江瑞安人, 博士/研究员, 主要研究方向: 海洋药理. E-mail: chenhaiamin@nbu.edu.cn

TNBS; κ-卡拉胶+TNBS 组, 先以 κ-卡拉胶灌喂处理 2 周后, 于第 15 天进行 TNBS 处理. 其中 κ-卡拉胶(Sigma 公司)首先加热溶解于生理盐水中再用来灌喂.

TNBS 处理方法: 将动物用异氟烷全身麻醉, 以聚氨酯脐导管小心插入到小鼠结肠(近端肛门 4 cm 处), 缓慢输注 0.1 mL 3% 的 TNBS 生理盐水乙醇溶液(1:1(V:V)).

从开始灌喂 κ-卡拉胶到 TNBS 灌喂后 2 d, 每天对小鼠死亡率进行记录, 实验周期 16 d. 用 TNBS 2 d 后对小鼠进行戊巴比妥钠腹腔注射法进行安乐死, 死亡后立刻解剖, 将全段结肠分离.

1.3 宏观评价

对结肠组织进行临床严重度宏观评价. 宏观评价使用标准为: 0 表示正常; 1 表示只有红斑; 2 表示红斑、轻度水肿、小糜烂; 3 表示有单个或多个出血性溃疡、炎症、中度粘连; 4 表示严重的溃疡和/或严重粘连.

1.4 总 RNA 提取

用 Ambion 公司的 mirVana™ RNA Isolation Kit (Applied Biosystem p/n AM1556)试剂盒对 0.1 g 小鼠结肠提取总 RNA. 将纯化后 RNA 取 0.2 μg 于 0.2 mL 离心管中, 加入 Agilent 公司的 Spike Mix 试剂 2 μL 及 T7 Promoter Primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') 0.8 μL, 65 °C 保温 10 min, 冰浴 5 min, 反转录成第 1 链 cDNA 及第 2 链 cDNA, 利用 Agilent 公司的荧光标记试剂盒对其进行荧光标记.

1.5 cDNA 样品片段化和芯片杂交

取 1.65 μg 标记后的 cDNA 进行片段化, 片段化试剂采用 Affymetrix 表达谱芯片试剂盒. 加入 11 μL 10×Blocking Agent 以及 2.2 μL 25×Fragmentation Buffer (南方基因公司), 加入 52.8 μL 水后在 60 °C 温浴 30 min, 冰浴 1 min. 将片段化后的 cDNA 加入 55 μL 2×GEx Hybridization Buffer 混匀, 上芯片(芯片为 Agilent Mouse Gene Expression (8×60K, Design ID: 028005)表达谱芯片), 65 °C 滚动杂交 17 h.

杂交结束, 芯片洗涤后, 于 Agilent 扫描仪中扫描, 分辨率 5 μm. 以 100% 和 10% PMT 各扫描 1 次, 2 次结果用 Agilent 软件自动合并.

1.6 生物信息学分析

登录 <http://bioinfo.capitabio.com/mas/> 对差异表

达基因相关生物学信息进行分析, 以确定该位点的基因功能. 登录 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 进行查询, 找到相关的差异表达基因.

1.7 实时定量 PCR 验证

NFKB1 等相关引物见表 1, *β-actin* 作为内参. 将提取的总 RNA 按照 Takara 反转录试剂盒说明书反转录成 cDNA 后进行实时定量 PCR 检测(Roche Light Cycler 96). 定量 PCR 方法可按照 Takara 的定量 PCR 试剂盒(Takara 公司)说明书进行.

PCR 循环条件: 预变性 94 °C, 3 min; 94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 40 个循环. 溶解: 95 °C, 15 s; 60 °C 60 s; 95 °C, 15 s. 用 Rotor-Gene 软件对 C_t 值进行分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算待测基因表达水平.

表 1 实时定量 PCR 引物

基因	引物	文献
<i>NFKB1</i>	F: 5'-AAAGCCCTGACAGTCCATTG-3'	[5]
	R: 5'-TTGCTAGACACCGTCTGTGC-3'	
<i>β-actin</i>	F: 5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAAG-3'	[6]
	R: 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'	
<i>Cyp2c55</i>	F: 5'-GGCCGTGTACCACCTTCATA-3'	[8]
	R: 5'-GACTGGATTGTGGGAGAATGA-3'	
<i>Gapdh</i>	F: 5'-AATGTGTCCGTCGTGGATCT-3'	[6]
	R: 5'-GGTCCTCAGTGTAGCCCAAG-3'	
<i>Nts</i>	F: 5'-CAATGCTGACCATCTTCCAG-3'	[9]
	R: 5'-TGTAGGGCCTTCTGGGTTTA-3'	
<i>TLR4</i>	F: 5'-GCTGCAACTGATGTTCTTCT-3'	[6]
	R: 5'-CCCAACATTTCATCCATCTCA-3'	

2 结果

2.1 κ-卡拉胶对 TNBS 诱导小鼠死亡及结肠损伤的影响

κ-卡拉胶处理组与空白组存活率均为 100%, TNBS 组存活率为 90%, 而 κ-卡拉胶协同 TNBS 组存活率下降为 80%. 结肠组织切片(图 1)显示: κ-卡拉胶对动物结肠没有炎症效果, 临床严重度为 0, 显示正常结肠黏膜状态; TNBS 单独作用时, 临床严重度为 3, 末端出现肉眼可见的炎症, 结肠略微缩短并增厚, 组织水肿和出血性变化的征兆也有表现; 而 κ-卡拉胶协同 TNBS 组临床严重度为 4, 出现更严重的结肠炎症, 有明显充血和病灶性黏膜坏死.

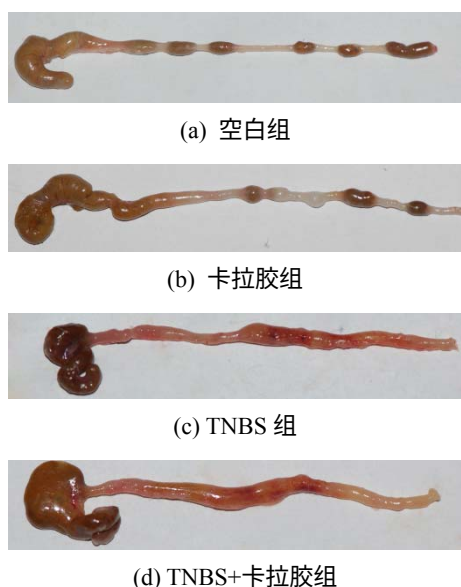


图1 TNBS及卡拉胶对小鼠结肠损伤的影响

2.2 κ -卡拉胶对小鼠结肠组织基因表达差异的影响

小鼠经 κ -卡拉胶处理后,差异基因为1173个,其中上调552个,下调621个。GO分析显示,变化最显著的分子功能为各类酶活性及运输和代谢过程。KEGG显示,差异表达基因的信号通路富集主要为各类生化代谢途径,如新陈代谢、细胞色素药物代谢、外源物代谢、维生素代谢等,但并未见有炎症相关的通路被激活(表2)。被激活的主要是个别家族的基因,如ADH家族、Ugt2b家族以及cyp3A家族等。

表2 κ -卡拉胶处理小鼠后的KEGG信号通路变化

通路	数量	P值
Metabolic pathways	68	7.13e-5
Drug metabolism-cytochrome P450	20	2.79e-11
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	19	2.41e-11
Neuroactive ligand-receptor interaction	17	2.45e-2
Retinol metabolism	16	1.40e-8
Cytokine-cytokine receptor interaction	15	3.52e-2
Drug metabolism-other enzymes	12	1.05e-6

2.3 TNBS作用后差异基因表达

TNBS组与空白组比较,差异基因为338个,生物学功能中,变化最显著的是炎症反应。经TNBS作用后,差异基因可以映射到11条显著富集的生物途径($P<0.05$),主要为Toll-like受体信号途径及各类蛋白和受体的表达变化(表3)。其中Toll-like受体通路中有大量基因出现显著差异表达,

如LBP上调6.5倍,CTSK上调2.75倍,CD14上调2.6倍,TNF上调2倍,IL-6上调153.8倍等。而其他通路未见如此多的差异基因。

表3 TNBS处理小鼠后的KEGG信号通路变化

通路	数量	P值
Toll-like receptor signaling pathway	5	2.69e-3
Focal adhesion	5	4.19e-2
Protein digestion and absorption	4	6.42e-3
ECM-receptor interaction	4	9.03e-3

2.4 κ -卡拉胶协同TNBS诱导后差异基因表达

κ -卡拉胶协同TNBS组与空白组比较,差异基因上升至3622个,其中上调1744个,下调1878个。GO分析显示,变化最显著的在代谢以及氧化还原过程($P<0.05$)。生物途径主要集中在致炎信号途径、各类代谢途径、蛋白和受体的表达变化等($P<0.05$)。

比较 κ -卡拉胶协同组和TNBS组显示出619个差异基因。变化最显著的生物学功能集中在氧化还原过程和细胞分化($P<0.05$)。生物途径主要涉及代谢反应及Toll-like受体介导的炎症反应以及细胞间相关变化(表4)。与TNBS比较,卡拉胶协同TNBS后,部分基因出现进一步上调(表5),激活了更多的Toll-like信号通路(图2),且有新的Toll-like信号通路基因发生显著差异表达,如CD40上调2.33倍, cxcl10(IP-10)上调7.3倍。此外,协同处理激活了与细胞黏附及细胞因子受体相互作用有关基因的上调,如cxcl14上调2.34倍, csf1上调2倍等。

表4 κ -卡拉胶协同TNBS处理小鼠后KEGG信号通路变化

通路	数量	P值
Metabolic pathways	40	2.89e-4
Drug metabolism-cytochrome P450	15	1.02e-10
Cytokine-cytokine receptor interaction	10	8.19e-8
Cell adhesion molecules (CAMs)	7	3.11e-2
Drug metabolism-other enzymes	7	1.38e-4
Toll-like receptor signaling pathway	6	1.40e-2

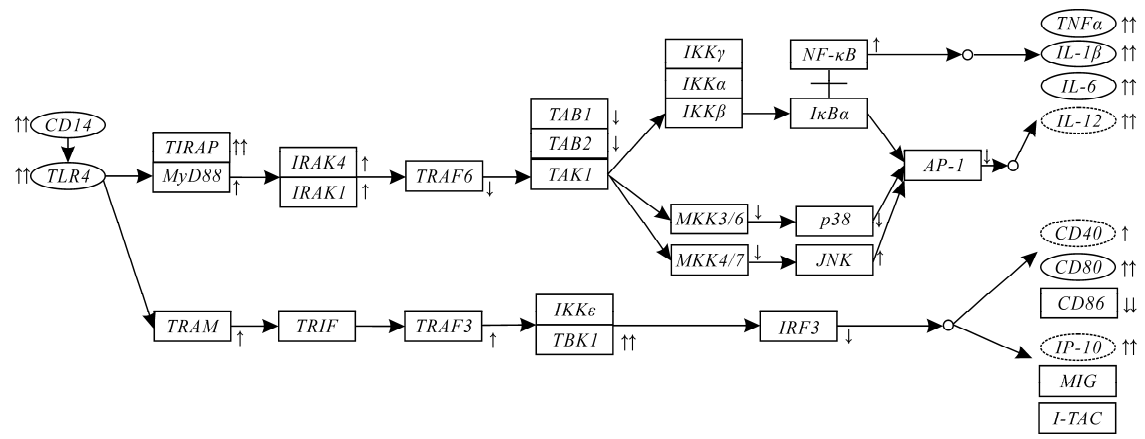
2.5 荧光定量PCR鉴定部分差异表达

选择6个相关基因进行实时定量PCR验证(表6)。在不同对比组中6个基因的表达趋势与表达谱芯片的结果趋势基本一致,表明本研究的芯片结果具有较好的准确性和可信度。

表 5 基因表达的变化(基因变化倍数)

基因	TNBS:空白	协同:TNBS	协同:空白	基因	TNBS:空白	协同:TNBS	协同:空白
<i>CD14</i>	2.66↑	2.85↑	7.598↑	<i>TIRAP</i>	1.460↑	1.450↑	2.110↑
<i>TLR4</i>	1.36↑	2.56↑	3.480↑	<i>MyD88</i>	1.230↑	1.190↑	1.466↑
<i>TNFα</i>	2.02↑	3.60↑	7.320↑	<i>IRAK4</i>	1.220↑	1.150↓	1.060↑
<i>IL-6</i>	153.80↑	9.68↑	1 488.4↑	<i>IRAK1</i>	1.230↑	1.120↓	1.100↑
<i>CD40</i>	1.39↓	2.33↑	1.680↑	<i>TRAM</i>	1.210↑	1.040↓	1.150↑
<i>cxcl10(IP-10)</i>	2.22↓	7.30↑	3.280↑	<i>TRAF6</i>	1.092↑	1.399↓	1.280↓
<i>P38</i>	1.74↓	1.00	1.740↓	<i>TAB1</i>	1.080↓	1.450↓	1.570↓
<i>JNK</i>	1.19↑	1.12↑	1.320↑	<i>TAB2</i>	1.040↓	1.180↓	1.230↓
<i>AP-1</i>	1.13↑	1.49↓	1.320↓	<i>NF-κB</i>	1.010↓	1.100↑	1.090↑
<i>IL-1</i>	7.92↑	3.99↑	31.590↑	<i>MKKs</i>	1.190↑	1.350↓	1.140↓
<i>IL-12</i>	1.08↓	3.51↑	3.270↑	<i>TRAF3</i>	1.390↑	1.140↑	1.580↑
<i>CD80</i>	2.15↑	6.23↑	13.390↑	<i>TBK1</i>	1.990↑	1.810↑	3.600↑
<i>CD86</i>	4.40↓	1.32↓	5.800↓	<i>IRF3</i>	1.090↑	1.150↓	1.050↓

注: ↑表示基因上调, ↓表示基因下调.



椭圆实框: κ-卡拉胶协同组较 TNBS 组显著上调的基因; 椭圆虚框: TNBS 组未上调, 但 κ-卡拉胶协同组显著上调的基因;
↑与 ↓表示基因在 TNBS 协同卡拉胶处理后的上调和下调变化, ↑↑表示基因显著上调, ↓↓表示基因显著下调

图 2 κ-卡拉胶协同 TNBS 处理后小鼠 Toll-like 受体(TLR)的信号通路

表 6 实时定量 PCR (qPCR)验证基因芯片结果(基因变化倍数)

κ-卡拉胶:空白			协同:空白			TNBS:空白			协同:TNBS		
基因	芯片	qPCR	基因	芯片	qPCR	基因	芯片	qPCR	基因	芯片	qPCR
<i>Cyp2c55</i>	0.09	0.08	<i>Cyp2c55</i>	0.01	0.02	<i>Cyp2c55</i>	0.01	0.61	<i>Cyp2c55</i>	0.02	0.02
<i>NFKP1</i>	1.06	0.86	<i>NFKP1</i>	1.54	2.08	<i>NFKP1</i>	1.54	1.30	<i>NFKP1</i>	1.25	1.49
<i>Nts</i>	0.00	0.00	<i>Nts</i>	0.00	0.01	<i>Nts</i>	0.00	0.89	<i>Nts</i>	0.01	0.01
<i>Tlr4</i>	1.33	0.79	<i>Tlr4</i>	3.48	1.94	<i>Tlr4</i>	3.48	1.23	<i>Tlr4</i>	2.56	1.52
<i>Actb</i>	1.00	1.10	<i>Actb</i>	1.29	1.54	<i>Actb</i>	1.29	1.18	<i>Actb</i>	1.12	1.30
<i>Gapdh</i>	1.01	1.00	<i>Gapdh</i>	1.13	1.00	<i>Gapdh</i>	1.13	1.00	<i>Gapdh</i>	1.11	1.00

3 讨论

研究显示, κ-卡拉胶单独处理并未对小鼠造成死亡及明显的组织伤害. 这与文献[1,3]研究的食

品级卡拉胶在不超过 5%的剂量下不会产生肠溃疡的结论相一致. 芯片结果显示, κ-卡拉胶导致大量基因的差异表达, 但主要发生在各类生化代谢途径中, 特别是大量关于酶的变化, 如 ADH(乙醇脱

氢酶)家族中的 *ADH1* 显著上调. Mondal 等^[11]指出, 卡拉胶可以作为 *ADH1* 的载体, 促进其对体内乙醇类物质的代谢. 此外, *CYPs* 相关基因和尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT)基因出现显著下调. 由于二者都参与外源有机分子的代谢, 如影响某些有毒物质或药物排出体外^[8,11], 说明卡拉胶可能影响机体的药物代谢, 这与 Ishikawa 等^[12]提到卡拉胶可以引起机体的药物代谢反应的结果相一致. 但本研究中 κ -卡拉胶单独处理的芯片结果并未显示出炎症反应.

TNBS 处理小鼠后产生了 10% 的死亡率, 并有明显的结肠组织损害. 芯片发现, 有大量的与炎症反应相关的基因发生显著差异表达, 如 Toll-like 受体信号途径中的 *TLR4*、*CD14*、*TNF α* 和 *IL-6* 等, 说明 TNBS 的致炎效应是通过 Toll-like 受体信号通路介导炎症应答, 这与文献^[13-14]的报道一致.

κ -卡拉胶协同 TNBS 处理小鼠死亡率达 20%, 较之单独用 TNBS 处理高了 10%, 小鼠结肠组织的伤害也较 TNBS 处理严重. 芯片结果显示, 在 TNBS 协同 κ -卡拉胶作用后出现大量的差异基因表达, 包含了单独 κ -卡拉胶组以及单独 TNBS 作用后所激活的基因. 此外, 致炎相关途径被加强, 部分致炎基因在 TNBS 的基础上出现平均 3 倍的上调, 如 *TLR4*、*CD14*、*TNF α* 、*IL-6* 等, 其中 *IL-6* 上调了 9.7 倍. 而 *CD40* 和 *cxc110* 等基因在 TNBS 组无上调, 但协同组却出现显著变化. *CD40* 是 *TLR* 家族免疫响应的一个重要调节器, 可以诱导 *IL-6*、*IL-12* 的产生^[15], *TLRs* 可通过产生各种趋化因子来管理宿主免疫应答, *TNF α* 诱导产生的 *cxc110* 正是其中的一个趋化因子^[16]. 因此, 二者的上调说明协同刺激可以增加 Toll-like 受体信号的致炎途径.

此外, 协同刺激较之 TNBS 单独处理, 还激活了细胞黏附及细胞因子受体相互作用基因, 如趋化因子 *cxc114*、菌落刺激因子 *csf1* 等基因上调约 2 倍. *cxc114* 可特异性地趋化单核细胞、树突状细胞和自然杀伤细胞, 承担免疫监视作用^[17-19], 而 *csf1* 可刺激巨噬细胞增强嗜菌能力和趋化活动^[20-21]. 因此, 上述基因的上调说明协同刺激从其他位点增加了 TNBS 对小鼠的免疫及炎症反应的影响.

综上所述, 单独作用一定剂量的卡拉胶并不会产生致炎作用, 但 κ -卡拉胶可能作为隐性致炎

因子, 协同 TNBS 加强或增加致炎途径.

参考文献:

- [1] COHEN S M, ITO N. A critical review of the toxicological effects of carrageenan and processed *Eucheuma* seaweed on the gastrointestinal tract[J]. Critical Reviews in Toxicology, 2002, 32(5):413-444.
- [2] GENEVA W H O. Safety evaluation of certain contaminants in food: Prepared by the sixty-fourth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA)[EB/OL]. [2016-09-09]. http://xueshu.baidu.com/s?wd=Safety+evaluation+of+certain+contaminants+in+food%3A+Prepared+by+the+sixty-fourth+meeting+of+the+joint+FAO%2FWHO+expert+committee+on+food+additives+%28JECFA%29%5BEB%2FOL%5D&rsv_b_p=0&tn=SE_baiduxueshu_c1gjeupa&rsv_spt=3&ie=utf-8&f=8&rsv_sug2=1&sc_f_para=sc_tasktype%3D%7BfirstSimpleSearch%7D&rsv_n=2.
- [3] WEINER M L. Food additive carrageenan Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies[J]. Critical Reviews in Toxicology, 2014, 44(3):244-269.
- [4] KITSDKAWA Y, SAITO H, SUZUKI Y, et al. Effect of ingestion of eicosapentaenoic acid ethyl ester on carrageenan-induced colitis in guinea pigs[J]. Gastroenterology, 1992, 102(6):1859-1866.
- [5] BHATTACHARYYA S, GILL R, CHEN M L, et al. Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NF κ B-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells[J]. Biol Chem, 2008, 283(16):10550-10558.
- [6] BORTHAKUR A, BHATTACHARYYA S, DUDEJA P K, et al. Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells[J]. Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(3):G829-G838.
- [7] BHATTACHARYYA S, XUE L, DEVKOTA S, et al. Carrageenan-induced colonic inflammation is reduced in Bcl10 null mice and increased in IL-10-deficient mice[EB/OL]. [2016-09-09]. <http://indigo.uic.edu/handle/10027/11172>.
- [8] CHEN H M, WANG F, MAO H H, et al. Degraded lambda-carrageenan activates NF- κ B and AP-1 pathways in macrophages and enhances LPS-induced TNF- α secretion through AP-1[J]. Biochim Biophys Acta, 1840, 7:2162-2170.
- [9] WU W, WANG F, GAO X, et al. Synergistic effect of κ -carrageenan on oxazolone-induced inflammation in BALB/c mice[J]. BMC Gastroenterol, 2016, 16(1):1-13.

- [10] WIRTZ S, NEURATH M F. Mouse models of inflammatory bowel disease[J]. *Advances in Drug Delivery Review*, 2007, 59:1073-1083.
- [11] MONDAL K, ROY I, GUPTA M N. κ -carrageenan as a carrier in affinity precipitation of yeast alcohol dehydrogenase[J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, 32(1):151-160.
- [12] KING C D, RIOS G R, GREEN M D, et al. UDP-glucuronosyltransferases[J]. *Current Drug Metabolism*, 2000, 1(2):143-161.
- [13] ISHIKAWA M, SASAKI K, OZAKI M, et al. Inhibition of hepatic drug biotransformation by carrageenan-induced inflammation in the rat: Effect of sex hormone alterations[J]. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 1992, 15(8):367-376.
- [14] BHATTACHARYYA S, GILL R, CHEN M L, et al. Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NF κ B-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283:10550-10558.
- [15] BORTHAKUR A, BHATTACHARYYA S, DUDEJA P K, et al. Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2007, 292:G829-G838.
- [16] CHANDEL H S, PANDEY S P, SHUKLA D, et al. Toll-like receptors and CD40 modulate each other's expression affecting *Leishmania* major infection[J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2014, 176(2):283-290.
- [17] FUKUI A, OHTA K, NISHI H, et al. Interleukin-8 and CXCL10 expression in oral keratinocytes and fibroblasts via Toll-like receptors[J]. *Microbiology and Immunology*, 2013, 57(3):198-206.
- [18] KURTH I, WILLIMANN K, SCHAEERLI P, et al. Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRK) in macrophage development[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2001, 194(6):855-861.
- [19] STARNES T, RASILA K K, ROBERTSON M J, et al. The chemokine CXCL14 (BRK) stimulates activated NK cell migration: Implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy[J]. *Experimental Hematology*, 2006, 34(8):1101-1105.
- [20] NEMUNAITIS J. Macrophage function activating cytokines: Potential clinical application[J]. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 1993, 14(2):153-171.
- [21] FIXE P, PRALORAN V. Macrophage colony-stimulating-factor (M-CSF or CSF-1) and its receptor: Structure-function relationships[J]. *European Cytokine Network*, 1997, 8(2):125-136.

Synergistic effects of κ -carrageenan on trinitrobenzene sulfonic acid induced intestinal inflammation in mice

ZHEN Zhang-he, WU Wei, CHEN Hai-min*

(Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: This study attempts to investigate the synergistic effects of κ -carrageenan on trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced BALB/c mice intestinal inflammation. BALB/c mice were treated with κ -carrageenan prior to administration of TNBS. The survival rate and histological changes of the colon tissue of mice were analyzed. The differentially expressed genes were analyzed by expression profile chip technology. The results indicated that TNBS-induced mortality and colonic damage were deteriorated by κ -carrageenan. Expression profile chip revealed that κ -carrageenan caused gene expression changes in metabolic pathways and other related pathways, but κ -carrageenan alone showed no proinflammatory effect. When mice were treated with TNBS, the significantly enriched pathways were closely related to inflammation. Compared to TNBS group, 619 genes were regulated in carrageenan+TNBS group. Some inflammation-related genes were further up-regulated. In summary, κ -carrageenan aggravated the TNBS-induced intestinal inflammation, which may be associated with the synergistical effects of κ -carrageenan on the enhancement of the TNBS via TLR4 pathway.

Key words: κ -carrageenan; trinitrobenzene sulfonic acid; synergy; intestinal inflammation

(责任编辑 史小丽)