

海藻多糖对仔猪小肠上皮细胞紧密连接蛋白及核转录因子- κ B 信号通路相关基因表达的影响

郭晓波^{1,2} 邹田德¹ 杨晋¹ 曾永娣¹ 王自蕊^{1*} 游金明^{1*}

(1.江西农业大学,江西省动物营养重点实验室,江西省营养饲料开发工程研究中心,江西省优质安全畜禽生产产教融合重点创新中心,南昌 330045; 2.赣州市畜牧研究所,赣州 341401)

摘要: 本试验旨在研究不同浓度海藻多糖对仔猪小肠上皮细胞(IPEC-J2细胞)紧密连接蛋白及核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路相关基因表达的影响。IPEC-J2细胞加入浓度分别为0(对照)、60、120和240 μ g/mL的海藻多糖处理培养基培养24 h,分析海藻多糖对IPEC-J2细胞机械屏障和免疫屏障相关基因以及蛋白表达的影响。结果表明:1)与对照组相比,60、120 μ g/mL的海藻多糖可以显著上调紧密连接蛋白闭锁蛋白(occludin)和闭合小环蛋白-1(ZO-1)的mRNA相对表达量($P<0.05$);但240 μ g/mL海藻多糖组occludin和ZO-1的mRNA相对表达量与对照组无显著差异($P>0.05$)。与对照组相比,120和240 μ g/mL的海藻多糖可以显著上调封闭蛋白-1(claudin-1)的mRNA相对表达量($P<0.05$)。与对照组相比,120、240 μ g/mL的海藻多糖可以显著上调claudin-1和ZO-1的蛋白相对表达量($P<0.05$)。2)与对照组相比,60、120和240 μ g/mL的海藻多糖均显著降低了髓样分化蛋白88(MyD88)和p65的mRNA相对表达量($P<0.05$),240 μ g/mL的海藻多糖显著降低了Toll样受体-4(TLR-4)和核转录因子- κ B抑制蛋白 α (I κ B α)的mRNA相对表达量($P<0.05$)。由此可知,海藻多糖可以上调IPEC-J2细胞紧密连接蛋白occludin、claudin-1和ZO-1的mRNA相对表达量,降低IPEC-J2细胞NF- κ B信号通路相关基因的表达,对改善仔猪小肠上皮细胞屏障功能具有积极的作用。

关键词: 海藻多糖;IPEC-J2;肠道屏障;紧密连接蛋白;NF- κ B信号通路

中图分类号:S828

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)06-2816-08

肠道是一种复杂的器官,既要保持对共生微生物群的耐受性,又要对入侵的病原微生物产生炎症反应^[1]。紧密连接是肠道上皮细胞之间的主要连接方式,而紧密连接蛋白是组成紧密连接结构的基础^[2]。紧密连接蛋白的表达量在一定程度上可以反映肠道机械屏障功能^[3-4]。肠道上皮细胞还能够通过分泌细胞因子、趋化因子调节肠道的免疫应答^[5]。因此,调节肠上皮细胞的紧密连接蛋白表达和细胞因子含量对维持肠道屏障功能具有十分重要的意义。研究表明,病原菌对肠道

细胞间的紧密连接结构具有破坏作用,使肠道的通透性增高,损坏肠道的屏障功能^[6-7]。而植物多糖作为一种生物活性物质,具有免疫调节和抗氧化化的功能^[8]。Wan等^[9]在饲料中添加海藻酸低聚糖后发现,仔猪的免疫性能和肠道屏障功能得到显著提高。饲料中添加岩藻多糖可促进小鼠脾细胞增殖和自然杀伤细胞活性,对预防和抵抗细菌病毒感染具有很好的效果^[10]。海带多糖可通过核转录因子- κ B(NF- κ B)、核因子E2相关因子2(Nrf2)、Toll样受体(TLR)等信号通路调节上皮

收稿日期:2020-01-07

基金项目:江西省生猪产业技术体系(JXARS-03-营养与饲料岗)

作者简介:郭晓波(1993—),女,河北张家口人,硕士研究生,研究方向为猪营养与饲料科学。E-mail: 348310587@qq.com

*通信作者:王自蕊,副教授,硕士生导师,E-mail: wangzirui0406@163.com;游金明,教授,博士生导师,E-mail: youjinm@163.com

细胞和淋巴细胞的增殖分化,提升机体免疫性能和肠道屏障功能^[11]。而岩藻糖则可促进大脑微血管内皮细胞紧密连接蛋白闭合小环蛋白-1(ZO-1)的表达,从而达到维持其上皮通透性的作用^[12]。目前,关于海藻多糖在调节仔猪肠道上皮细胞紧密连接蛋白和NF- κ B炎症信号通路相关基因表达方面的研究还尚未见报道,不同浓度海藻多糖对细胞水平上屏障功能的作用效果还不明确。当前学者对海藻多糖的研究大多都集中在海藻多糖的医疗保健作用方面,而在生猪方面的应用研究较少,仅有少数的研究表明其可以提高仔猪的生长性能和改善肠道菌群结构。因此,本试验旨在通过研究不同浓度海藻多糖对仔猪小肠上皮细胞紧密连接蛋白闭锁蛋白(occludin)、封闭蛋白-1(claudin-1)和ZO-1及炎症通路相关蛋白髓样分化蛋白88(MyD88)、p65、TLR-4和核转录因子- κ B抑制蛋白 α (I κ B α)基因表达,以及细胞上清液中促炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)含量的分析,探讨海藻多糖对仔猪小肠上皮细胞屏障功能的调控作用,以期海藻多糖对仔猪肠道健康的调节作用提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 海藻多糖

海藻多糖纯度为99%,主要成分为L-岩藻糖和D-木糖。配制时用DMEM:F12培养基(Gibco公司,美国)溶解,0.22 μ m除菌过滤器过滤除菌,现用现配。

1.1.2 仔猪小肠上皮细胞

仔猪小肠上皮细胞(IPEC-J2细胞)由中国农业大学农业部饲料工业中心馈赠。

1.2 试验方法

1.2.1 IPEC-J2细胞培养

完全培养基的配制:89% DMEM:F12(体积比1:1)+10%胎牛血清(Bioind公司,以色列)+1%的双抗(索莱宝科技有限公司,北京),吹打混匀,4 $^{\circ}$ C保存,1周内使用。

IPEC-J2细胞采用75 cm^2 的细胞瓶培养,细

胞培养于5%的CO₂培养箱(Thermo公司,美国),24 h换液1次,待细胞融合80%,采用0.25%的胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化。1 200 r/min离心5 min后将细胞接种于6孔板上,每孔接种细胞数量为 6×10^4 个/孔,细胞培养24 h后加入终浓度分别为0(对照)、60、120和240 μ g/mL的海藻多糖处理培养基,继续培养24 h后用于后续试验测定。

1.2.2 mRNA表达量测定

采用实时荧光定量PCR法测定IPEC-J2细胞occludin、claudin-1、ZO-1、TLR-4、I κ B α 、MyD88和p65的mRNA相对表达量。根据GenBank提供的猪基因序列,用Primer Express 5.0软件设计occludin、claudin-1、ZO-1、TLR-4、I κ B α 、MyD88和p65的基因特异性扩增引物。引物序列见表1,引物由上海生物工程有限公司合成。

按照Trizol试剂盒(TaKaRa,日本)使用说明提取总RNA。RNA质量和浓度使用超微量核酸分析仪(Biodrop公司,英国)进行检测,其纯度以A260/A280比值介于1.8~2.0为使用标准。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参基因,根据PrimeScriptTM RT-reagent Kit(TaKaRa,日本)说明书步骤,采用两步法将RNA反转录为cDNA。以反转录产物cDNA为模板使用荧光定量PCR(CFX96, Bio-Rad公司,英国)进行基因扩增,荧光定量PCR体系组成见表2。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 3 min预变性,95 $^{\circ}$ C 10 s变性;58 $^{\circ}$ C 30 s延伸;40个循环。各组基因的mRNA相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.2.3 蛋白质免疫印迹

当IPEC-J2细胞融合至80%~90%时,弃去细胞培养板中的培养基,磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗3次,加入300 mL放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液,分别加入10 μ L的蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和苯甲基磺酰氟(PMSF),吹打混匀,冰上静置30 min使细胞充分裂解,收集细胞于1.5 mL的EP管中,高速冷冻离心机4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心30 min,收集上清液。加入上样缓冲液(loading buffer)吹打混匀,放入开水中煮沸5 min。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心5 min,收集上清。

表 1 IPEC-J2 细胞实时荧光定量 PCR 特异性引物序列

Table 1 Specific primer sequence for real-time fluorescence quantification PCR of IPEC-J2 cells

基因 Genes	序列号 Accession No.	引物序列 Primer sequences (5'—3')	产物长度 Product length/bp
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>GAPDH</i>	NM_001206359.1	F: GAAGGTCGGAGTGAACGGAT R: CATGGGTAGAATCATACTGGAACA	149
闭锁蛋白 Occludin	NM_001163647.2	F: CAGGTGCACCCTCCAGATTG R: TGGACTTTCAAGAGGCCTGG	111
封闭蛋白-1 Claudin-1	FM205928.1	F: CTGCTTCTCTCTGCCTTCTG R: GGAAGGCGAAGGTTTTGGAT	91
闭合小环蛋白-1 <i>ZO-1</i>	XM_021098827.1	F: GAGGATGGTCACACCGTGGT R: GGAGGATGCTGTTGTCTCGG	169
Toll 样受体-4 <i>TLR-4</i>	NM_001113039.2	F: GCAATAGCTTCTCCAGCTTTCC R: CCCGTCAGTATCAAGGTGGA	121
核转录因子- κ B 抑制蛋白 α <i>IκBα</i>	NM_001005150.1	F: TGCAGGCCACCAACTACAAT R: TCAACAAGAGCGACACCAGG	186
髓样分化蛋白 88 <i>MyD88</i>	NM_001099923.1	F: GGTGCCAGGCAGGACATC R: GGCAGCTGGAACAGACCAA	68
<i>p65</i>	XM_024454069.1	F: AACAGCAGATGGCCCATAACC R: TTTACTAGATGCGCCAGGG	116

表 2 荧光定量体系组成

Table 2 Fluorescence quantification PCR system composition

组成 Composition	用量 Dosage μ L
TB Green™ Premix EX Taq II	2.0
正向引物 Forward primer (10 μ mol/L)	0.8
反向引物 Reverse primer (10 μ mol/L)	0.8
参比染色剂 ROX reference dye (50 \times)	0.4
cDNA 模板 cDNA model	2.0
蒸馏水 dH ₂ O	6.0
合计 Total	20.0

采用 BCA 试剂盒(碧云天生物有限公司)测定上清液蛋白样品的浓度。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法分离蛋白,湿转法将蛋白转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,牛血清白蛋白(BSA)封闭 2 h,分别用 Occludin (66378-1-Ig, Proteintech 公司,美国)、ZO-1 (21773-1-AP, proteintech 公司,美国)、Claudin-1 (ab15098, Abcam 公司,英国)、p65 (ab16502, Abcam 公司,英国)、磷酸化 p65 (p-p65) (orb6504, Biorbty 公司,英国)一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, β -肌动蛋白(β -actin) (ta-09, ZSGB-BIO 生物技术有限公

司)作为内参,根据一抗物种来源,选用辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体(ab6721, Abcam 公司,英国)或 HRP 标记的羊抗鼠抗体(ab6789, Abcam 公司,英国)孵育 2 h,再用电化学发光(ECL, Transgen 生物科技有限公司)显色,曝光拍照,用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.2.4 酶联免疫吸附试验

用海藻多糖处理培养皿中的 IPEC-J2 细胞后,收集培养基于离心管,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 min,取上清待测。根据 IL-6 和 TNF- α 试剂盒(六合生物有限公司)操作步骤,将标准品工作液和待测样品加入酶标板中,每孔 100 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 90 min。弃去液体,每孔加入 100 μ L 的生物素化抗体工作液,覆膜,37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 60 min。洗板 3 次。每孔中加入酶结合工作液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min,重复洗板 3 次。每孔加入底物溶液 90 μ L,覆膜置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中避光孵育 15 min。最后向每孔加入终止液 50 μ L,终止反应后 30 min 之内用酶标仪在波长 450 nm 处测量各孔的吸光度(OD)值。以标准品含量为横坐标,OD 值为纵坐标,采用 Logistic 曲线拟合得到曲线回归方程[决定系数(R^2)>0.99],计算出海藻多糖处理的 IPEC-J2 细胞上清液中促炎症因子 IL-6 和 TNF- α 含量。

1.3 统计分析

所有数据用 Excel 2010 进行简单处理后,采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析, Duncan 氏法进行多重比较, 各组数据以“平均值 \pm 标准误”表示, $P < 0.05$ 为显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 海藻多糖对仔猪小肠上皮细胞机械屏障的影响

由图 1 可知, 与对照组相比, 60 和 120 $\mu\text{g/mL}$ 的海藻多糖可以显著上调紧密连接蛋白 occludin 和 ZO-1 的 mRNA 相对表达量 ($P < 0.05$); 但海藻多糖浓度达 240 $\mu\text{g/mL}$ 时, occludin 和 ZO-1 的 mRNA 相对表达量与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。与对照组相比, 60 $\mu\text{g/mL}$ 的海藻多糖可以上调 claudin-1 的 mRNA 相对表达量, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 120 和 240 $\mu\text{g/mL}$ 的海藻多糖可以显著上调 claudin-1 的 mRNA 相对表达量 ($P < 0.05$)。

由图 2 可知, 与对照组相比, 60、120、240 $\mu\text{g/mL}$ 的海藻多糖对紧密连接蛋白 occludin 的蛋白相对表达量没有显著影响 ($P > 0.05$); 但 120、240 $\mu\text{g/mL}$ 海藻多糖可以显著上调 claudin-1 和 ZO-1 的蛋白相对表达量 ($P < 0.05$)。

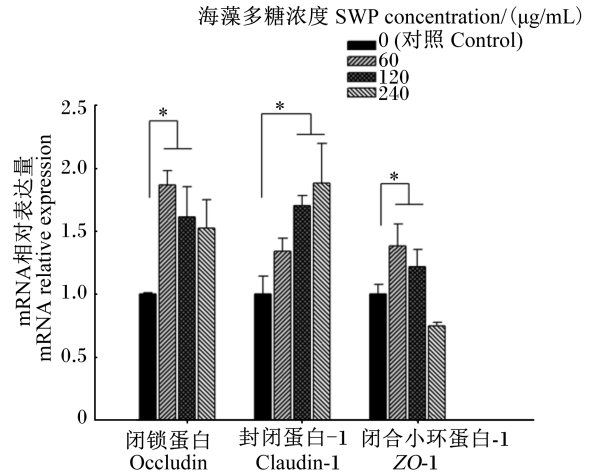
2.2 海藻多糖对仔猪小肠上皮细胞免疫屏障的影响

2.2.1 海藻多糖对 IPEC-J2 细胞 NF- κ B 通路相关基因和蛋白表达的影响

由图 3 可知, 随着海藻多糖浓度的增加, *TLR-4*、*I κ B α* 、*MyD88*、*p65* 的 mRNA 相对表达量呈逐渐下降趋势。与对照组相比, 60、120 和 240 $\mu\text{g/mL}$ 的海藻多糖均显著降低了 *MyD88* 和 *p65* 的 mRNA 相对表达量 ($P < 0.05$); 240 $\mu\text{g/mL}$ 的海藻多糖显著降低了 *TLR-4* 和 *I κ B α* 的 mRNA 相对表达量 ($P < 0.05$), 而 60、120 $\mu\text{g/mL}$ 的海藻多糖对 *TLR-4* 和 *I κ B α* 的 mRNA 相对表达量没有显著影响 ($P > 0.05$)。不同浓度海藻多糖对 IPEC-J2 细胞 NF- κ B 通路 p65 和 p-p65 的蛋白相对表达没有显著影响 ($P > 0.05$)。尽管 240 $\mu\text{g/mL}$ 的海藻多糖引起 p-p65 的蛋白表达量和 p-p65/p65 较大程度的降低, 但未达到显著水平 ($P > 0.05$)。

2.2.2 海藻多糖对 IPEC-J2 仔猪小肠上皮细胞促炎症因子含量的影响

由图 4 可知, 与对照组相比, 60、120 和 240 $\mu\text{g/mL}$ 的海藻多糖对 IPEC-J2 细胞促炎症因子 IL-6 和 TNF- α 含量没有显著影响 ($P > 0.05$)。



* 表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

* mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

图 1 海藻多糖对 IPEC-J2 细胞紧密连接蛋白 mRNA 表达的影响

Fig.1 Effects of SWP on mRNA expression of tight junction protein in IPEC-J2 cells ($n = 3$)

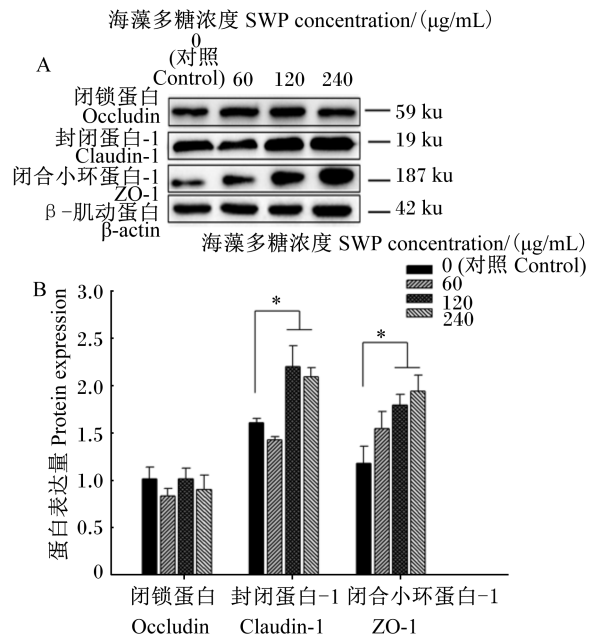


图 2 海藻多糖对 IPEC-J2 细胞紧密连接蛋白蛋白表达的影响

Fig 2 Effects of SWP on protein expression of tight junction protein in IPEC-J2 cells ($n = 3$)

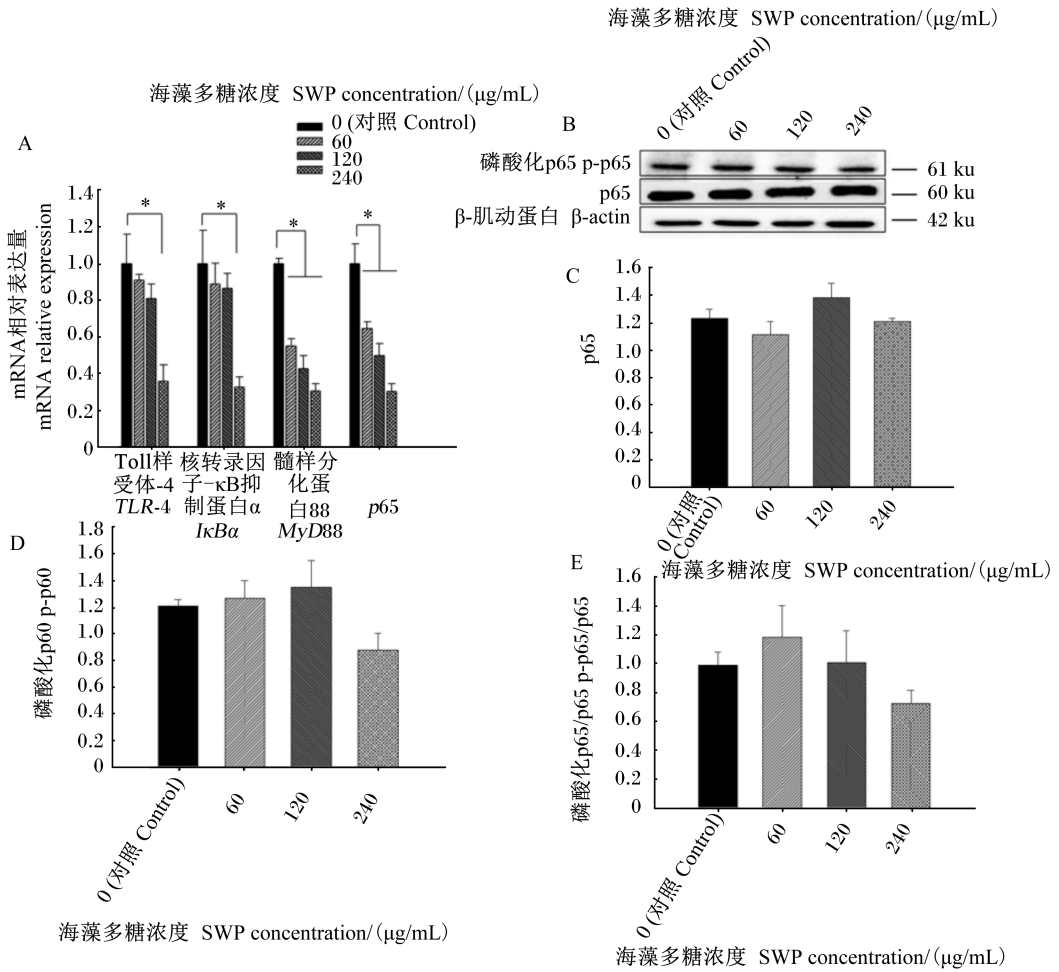


图 3 海藻多糖对 NF-κB 信号通路相关基因和蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of SWP on expression of NF-κB signaling pathway related gene and protein (n=3)

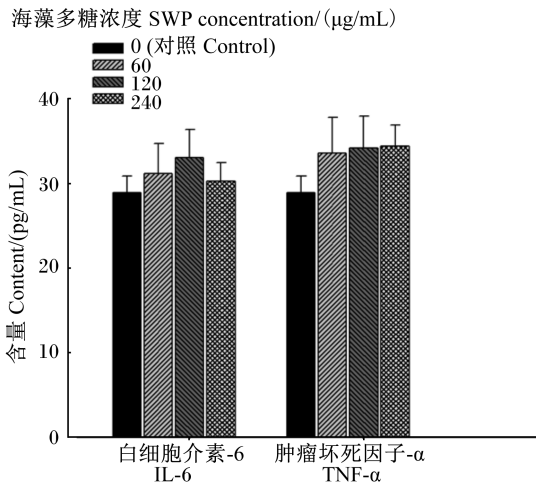


图 4 海藻多糖对 IPEC-J2 细胞促炎因子 IL-6 和 TNF-α 含量的影响

Fig.4 Effects of SWP on contents of proinflammatory factors IL-6 and TNF-α in IPEC-J2 cells (n=3)

3 讨论

3.1 海藻多糖对仔猪小肠上皮细胞机械屏障的影响

肠道中的紧密连接是一个高度动态的屏障结构,可以通过调节细胞之间的通透性而选择性吸收水分、离子及营养物质^[13]。肠道紧密连接结构的完整性对肠道的防御和免疫起着很大的作用,紧密连接蛋白作为连接肠道上皮细胞之间的桥梁,在一定范围内,紧密连接蛋白表达的上调对机体的紧密连接具有促进作用^[2]。研究表明,多糖类营养素(植物多糖)在促进紧密连接蛋白的表达、维持肠道上皮的完整性方面发挥了重要作用^[14-15]。例如,刺五加多糖可以有效缓解脂多糖(LPS)刺激后小鼠肠道通透性的变化,同时促进 occludin 和 ZO-1 蛋白的表达^[16]。而海藻酸钠寡

糖可以显著改善断奶仔猪的肠道形态结构,促进紧密连接蛋白 occludin 和 ZO-1 蛋白的表达^[16]。本试验结果显示,海藻多糖对 IPEC-J2 细胞紧密连接蛋白的表达同样具有明显的上调作用,其中 occludin 和 ZO-1 的 mRNA 相对表达量随着海藻多糖浓度的增高而降低, claudin-1 的 mRNA 相对表达量和 ZO-1 的蛋白相对表达量随着海藻多糖浓度的增高而增高,同时,当海藻多糖浓度为 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, claudin-1 的蛋白相对表达量达到最高。综上所述, 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的海藻多糖可以显著上调紧密连接蛋白 occludin、claudin-1 和 ZO-1 的 mRNA 相对表达量以及 claudin-1 和 ZO-1 蛋白相对表达量,在调节肠道上皮细胞紧密连接表达中作用最佳。

3.2 海藻多糖对仔猪小肠上皮细胞免疫屏障的影响

NF- κ B 信号通路是机体内免疫调节的经典通路,可以调控机体内很多生理活动^[17]。NF- κ B 信号通能够影响相应炎症因子的表达,进而介导炎症反应^[18]。海藻多糖是一种生物活性物质,大量的研究表明其有一定的抗病毒和免疫调节作用^[19-21]。有学者选择红藻多糖对肥大小鼠进行试验后发现,红藻多糖可以显著降低肥大小鼠体内的炎症反应,表现出对小鼠机体的一致炎症效果^[22]。还有研究发现,海带多糖能显著下调仔猪结肠黏膜中炎症因子 IL-6、白细胞介素-17 (IL-17) 及白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的 mRNA 相对表达量,降低肠道炎症反应,并改善肠道健康^[23]。而褐藻提取物对 LPS 诱导下仔猪结肠细胞炎症因子 IL-6、白细胞介素-8 (IL-8)、TNF- α 的 mRNA 相对表达量具有明显的下调作用^[24]。本试验结果表明,海藻多糖下调了 NF- κ B 信号通路 TLR-4、I κ B α 、MyD88 和 p65 基因的表达,这与 Sanjeeva 等^[25]报道海藻多糖可通过 NF- κ B 信号通路缓解 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应结果相似。NF- κ B 信号通路为炎症信号通路,相关基因表达下调,表明海藻多糖对肠道上皮细胞具有一定的抑炎作用,可有效预防肠道炎症的发生,进而维持肠道屏障功能的完整性。本试验发现,随着海藻多糖浓度的增高,TLR-4、I κ B α 、MyD88 和 p65 的 mRNA 相对表达量呈现递减趋势,在预防炎症肠道反应中添加浓度为 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 海藻多糖为宜。至于海藻多糖促进了 NF- κ B 信号通路相关基因的表达,

而尚未对 IL-6 和 TNF- α 含量产生显著影响,可能是由于本试验条件下酶联免疫吸附反应时间不够,或者是海藻多糖所添加的剂量梯度不够。

4 结论

海藻多糖利于维持上皮屏障功能的完整性,促进紧密连接蛋白的表达,同时可通过下调 NF- κ B 炎症信号通路相关基因表达有效预防肠道炎症的发生,对改善仔猪小肠上皮细胞屏障功能具有积极作用。120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的海藻多糖的对肠道完整性的作用效果最佳,240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的海藻多糖的对肠道炎症的作用效果最佳。

参考文献:

- [1] 吴兆海. 粪菌移植对被动免疫失败犊牛肠道屏障功能及肠道菌群构建的影响[D]. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [2] 黄妍君. 维生素 E 及其衍生物对肠道屏障结构蛋白的保护作用研究[D]. 硕士学位论文. 长沙: 湖南师范大学, 2018: 1-2.
- [3] FANNING A S, MITIC L L, ANDERSON J M. Transmembrane proteins in the tight junction barrier[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 1999, 10(6): 1337-1345.
- [4] 刘畅. 探究 TLR4 对小鼠肠黏膜紧密连接蛋白的调控作用[D]. 硕士学位论文. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [5] 崔勇鹤, 孙少明, 李占武, 等. 肠道上皮细胞在肠道免疫屏障中的维护及炎性肠病发生机制[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(2): 160-162.
- [6] 夏溪. 猪抗菌肽 PR39 抗细菌感染和保护肠道屏障功能的作用及其机制研究[D]. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [7] 王凤杰. HIV-1 感染致肠道上皮紧密连接异常的分子机制[D]. 博士学位论文. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2019: 13-116.
- [8] CUMASHI A, USHAKOVA N A, PREOBRAZHENS-KAYA M E, et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds[J]. Glycobiology, 2007, 17(5): 541-552.
- [9] WAN J, JIANG F, XU Q S. Alginate oligosaccharide accelerates weaned pig growth through regulating antioxidant capacity, immunity and intestinal development[J]. RSC Advances, 2016, 6(90): 87026-87035.

- [10] HWANG P A, LIN H V, LIN H Y, et al. Dietary supplementation with low-molecular-weight fucoidan enhances innate and adaptive immune responses and protects against *Mycoplasma pneumonia* antigen stimulation [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(3):175.
- [11] CIAN R E, DRAGO S R, DE MEDINA F S, et al. Proteins and carbohydrates from red seaweeds: evidence for beneficial effects on gut function and microbiota [J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(8):5358–5383.
- [12] CHOI Y S, EOM S Y, KIM I S, et al. Fucoidan extracted from hijiki protects brain microvessel endothelial cells against diesel exhaust particle exposure-induced disruption [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2016, 19(5):466–471.
- [13] 赵省如. 决明子对小鼠肠道屏障影响的研究 [D]. 硕士学位论文. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [14] 刘珂, 邱炳勋, 邹利, 等. 黄芪及其有效成分对内皮细胞及其连接的保护作用及机制研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(21):3912–3917.
- [15] 谢红兵, 邹云, 刘丽莉, 等. 植物多糖对断奶仔猪小肠黏膜形态及肠黏膜屏障功能的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(1):150–157, 187.
- [16] HAN J, LI J, BAI G, et al. *Acanthopanax senticosus* polysaccharides-induced intestinal tight junction injury alleviation via inhibition of NF- κ B/MLCK pathway in a mouse endotoxemia model [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2017, 23(12):2175–2184.
- [17] WERTZ I E, DIXIT V M. Signaling to NF- κ B: regulation by ubiquitination [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(3):a003350.
- [18] 游金明, 郭晓波, 王自蕊, 等. 海藻多糖的免疫调节作用及其在畜禽生产中的应用 [J]. *饲料工业*, 2017, 38(20):1–5.
- [19] HEIM G, O' DOHERTY J V, O' SHEA C J, et al. Maternal supplementation of seaweed-derived polysaccharides improves intestinal health and immune status of suckling piglets [J]. *Journal of Nutritional Science*, 2015, 4:e27.
- [20] JEONG S Y, SEOL D W. The role of mitochondria in apoptosis [J]. *BMB Reports*, 2008, 41(1):11–22.
- [21] AISA Y, MIYAKAWA Y, NAKAZATO T, et al. Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways [J]. *American Journal of Hematology*, 2005, 78(1):7–14.
- [22] NEELAKANDAN Y, VENKATESAN A. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of sulfated polysaccharide fractions from *Sargassum wightii* and *Halophila ovalis* in male Wistar rats [J]. *Indian Journal of Pharmacology*, 2016, 48(5):562–570.
- [23] WALSH A M, SWEENEY T, O' SHEA C J, et al. Effects of supplementing dietary laminarin and fucoidan on intestinal morphology and the immune gene expression in the weaned pig [J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(Suppl.4):284–286.
- [24] BAHAR B, O' DOHERTY J V, HAYES M, et al. Extracts of brown seaweeds can attenuate the bacterial lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in the porcine colon ex vivo [J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(Suppl.4):46–48.
- [25] SANJEEWA K K A, JAYAWARDENA T U, KIM H S, et al. Fucoidan isolated from *Padina commersonii* inhibit LPS-induced inflammation in macrophages blocking TLR/NF- κ B signal pathway [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 224:115195.

Effects of Seaweed Polysaccharides on Expression of Tight Junction Protein and Related Genes in Nuclear Transcription Factor- κ B Signaling Pathway in Porcine Epithelial Cells

GUO Xiaobo^{1,2} ZOU Tiande¹ YANG Jin¹ ZENG Yongdi¹ WANG Zirui^{1*} YOU Jinming^{1*}

(1. Jiangxi Province Key Innovation Center for Industry-Education Integration of High Quality and Safety Livestock Production, Jiangxi Province Feed Development Engineering Research Center, Jiangxi Province

Key Laboratory of Animal Nutrition, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045,

China; 2. Ganzhou Animal Husbandry Research Institute, Ganzhou 341401, China)

Abstract: This study aimed to evaluate the effects of different concentration of seaweed polysaccharides on expression of tight junction protein and related genes in nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway in porcine epithelial cells (IPEC-J2 cells). The IPEC-J2 cells were treated with seaweed polysaccharides culture medium with concentrations of 0 (control), 60, 120 and 240 μ g/mL, cultured for 24 h, and the effects of seaweed polysaccharides on expression of mechanical barrier and immune barrier related gene and protein in IPEC-J2 cells were analysed. The results showed as follows: 1) compared with the control group, 60 and 120 μ g/mL seaweed polysaccharides significantly upregulated the mRNA relative expression levels of occludin and zonula occluden-1 (ZO-1) ($P < 0.05$); but no significant differences were observed in the mRNA relative expression levels of occludin and ZO-1 between control group and 240 μ g/mL seaweed polysaccharides group ($P > 0.05$). Compared with control group, 120 and 240 μ g/mL seaweed polysaccharides significantly upregulated the mRNA relative expression level of claudin-1 ($P < 0.05$). Compared with control group, 120 and 240 μ g/mL seaweed polysaccharides significantly upregulated the protein relative expression levels of claudin-1 and ZO-1 ($P < 0.05$). 2) Compared with control group, 60, 120 and 240 μ g/mL seaweed polysaccharides significantly decreased the mRNA relative expression levels of myeloid differentiation protein 88 (MyD88) and p65 ($P < 0.05$), and 240 μ g/mL seaweed polysaccharides significantly decreased the mRNA relative expression levels of Toll like receptor-4 (TLR-4) and nuclear transcription factor inhibitor protein α (I κ B α) ($P < 0.05$). In conclusion, seaweed polysaccharides can upregulate the mRNA relative expression levels of occludin, claudin-1 and ZO-1 in IPEC-J2 cells, and decrease the expression of NF- κ B signaling pathway related gene in IPEC-J2 cells, and have positive effects on improv the barrier function of porcine epithelial cells. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(6):2816-2823]

Key words: seaweed polysaccharide; IPEC-J2; intestinal barrier; tight junction protein; NF- κ B signaling pathway

* Corresponding authors: WANG Zirui, associate professor, E-mail: wangzirui0406@163.com; YOU Jinming, professor, E-mail: youjinm@163.com (责任编辑 武海龙)