

茶树油对脂多糖诱导的奶牛瘤胃上皮细胞炎症因子表达的影响

马晓宇^{1,2,3} 彭程^{1,2,3} 詹康^{1,2,3} 占今舜⁴ 杨天宇^{1,2,3} 宁丽丽^{1,2,3} 赵国琦^{1,2,3*}

(1.扬州大学动物科学与技术学院,扬州 225009;2.扬州大学农业科技发展研究院,扬州 225009;3.扬州大学教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室,扬州 225009;4.江西省农业科学院畜牧兽医研究所,南昌 330200)

摘要: 本试验旨在研究茶树油(TTO)对脂多糖(LPS)诱导的奶牛瘤胃上皮细胞(BRECs)炎症因子表达的影响。利用CCK-8法测定浓度为0(对照)、0.006 25%、0.012 5%、0.025%、0.05%、0.1%的TTO对BRECs活力的影响,每组6个重复,根据试验结果筛选出TTO的适宜浓度为0.05%,以此浓度做后续试验。再利用实时荧光定量PCR、蛋白质印迹法,分别探究BRECs中炎症因子在基因水平以及蛋白水平表达量的变化。试验分为4组:对照组不添加TTO和LPS;TTO组仅添加0.05%的TTO;LPS组仅添加1 μg/mL LPS;LPS+TTO组添加1 μg/mL LPS和0.05% TTO,每组6个重复。结果表明:1)与对照组相比,添加0.05% TTO显著提高BRECs的活力($P<0.05$);添加0.1% TTO显著抑制BRECs的活力($P<0.05$)。2)与对照组相比,TTO组白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和Toll样受体-4(TLR-4)的基因表达量均显著降低($P<0.05$),LPS组白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、白细胞介素-8(IL-8)、TNF- α 、TLR-4基因表达量显著升高($P<0.05$);与LPS组相比,在LPS中添加TTO显著降低IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、TLR-4的基因表达量($P<0.05$)。3)与对照组相比,LPS可以提高核因子- κ B(NF- κ B)通路中p65、磷酸化-p65(p-p65)蛋白表达量,添加LPS+TTO与仅添加LPS相比可以降低p65、p-p65蛋白表达量。综上所述,低浓度的TTO可以提高BRECs的活力,抑制LPS诱导的BRECs炎症信号通路NF- κ B相关蛋白表达,进而抑制促炎因子产生。

关键词: 茶树油;瘤胃上皮细胞;NF- κ B;促炎症因子

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2020)12-5903-07

亚急性瘤胃酸中毒(SARA)是奶牛营养相关的代谢性疾病,发病率高。商业化养殖场中,高产奶牛饲喂高精料从而提高产奶量,但会降低瘤胃pH和微生物活性,提高SARA的风险^[1]。国外研究表明,在集约化奶牛养殖场中,超过19%的早期泌乳奶牛和26%的中期泌乳奶牛患有SARA^[2]。SARA降低了产奶量、乳脂率、乳蛋白率,使动物过早的淘汰,造成较大经济损失^[2-3]。患有SARA的奶牛的瘤胃中脂多糖(LPS)含量升高引起瘤胃炎

症^[4]。Nyati等^[5]研究小鼠胚胎成纤维细胞表明,LPS激活炎症信号核因子- κ B(NF- κ B)通路,进一步促进炎症因子[如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)]的表达。Wellnitz等^[6]报道,LPS作用于奶牛乳腺上皮细胞会刺激炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6生成。Zhang等^[7]报道,LPS可诱导荷斯坦奶牛瘤胃上皮细胞多种炎症细胞因子mRNA表达量升高。LPS对于炎症起到重要的介质作用,并且可以诱导瘤

收稿日期:2020-05-24

基金项目:江苏省自然科学基金(SBK2019043455);国家自然科学基金项目(31972589);江西现代农业科研协同创新专项(JXX-TCX201702-04)

作者简介:马晓宇(1997—),女,山东潍坊人,硕士研究生,从事反刍动物营养、生产与环境研究。E-mail: maxiaoyu0417@163.com

*通信作者:赵国琦,教授,博士生导师,E-mail: gqzhao@yzu.edu.cn

胃组织的炎症。茶树油(TTO)是互叶白千层叶子经水蒸气蒸馏得到的无色至淡黄色轻油状液体^[8]。TTO大约包含100种化合物,主要包括松油醇-4、 α -松油醇、 α -松油烯等^[9-12]。TTO对小鼠淋巴细胞产生的促炎细胞因子有抑制作用^[13-14]。Nogueira等^[15]报道,TTO可抑制LPS诱导巨噬细胞中*IL-1 β* 、*TNF- α* 、*IL-8*的表达。TTO良好的杀菌、抗炎作用得到了科学的验证^[8]。但目前TTO在LPS刺激奶牛瘤胃上皮细胞是否有抗炎作用尚未有明确定论。因此,本研究旨在研究TTO对LPS诱导的奶牛瘤胃上皮细胞炎症因子表达的影响,为TTO的应用提供科学的参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

TTO:由无锡市某生物科技有限公司提供,其主要成分为松油醇-4>60%、对伞花烃5%~10%、桉叶素2%~10%、 α -松油醇>3%、 α -松油烯<10%、 α -派烯<0.5%。

奶牛瘤胃上皮细胞:由扬州大学动物培养物保藏应用研究所(IACCA)提供。

试验试剂和仪器:DMEM/F12培养基、非必需氨基酸(NEAA)、磷酸盐缓冲液(PBS)和胰蛋白酶(Gibco,美国);LPS、青霉素、链霉素、L-谷氨酰胺溶液、乙二醇四乙酸(Sigma,美国);Gemini胎牛血清、荧光定量96孔板和8连管(Bio-rad,美国);PrimeScriptTM RT Master Mix和SYBR[®] Premix Ex TaqTM II(TaKaRa,中国);总RNA提取试剂盒(Tiangen,中国);CCK-8(Dojindo,中国);玻璃板、

塑料槽、盖玻片、梳子、电泳槽等。

1.2 试验方法

1.2.1 TTO对奶牛瘤胃上皮细胞毒性的影响

将TTO用0.1%的二甲基亚砷(DMSO)溶解,收集对数生长期的奶牛瘤胃上皮细胞,在96孔板中每孔接种 5×10^3 个奶牛瘤胃上皮细胞。培养12 h后,在96孔板中分别加入含有0(对照)、0.006 25%、0.012 5%、0.025%、0.05%、0.1%TTO的DMEM/F12培养基,每组6个重复。培养24 h后,用CCK-8试剂盒测定TTO对奶牛瘤胃上皮细胞的毒性。

1.2.2 TTO对炎症细胞因子表达的影响

将培养到一定密度的奶牛瘤胃上皮细胞收集于6孔板中,每孔 1×10^5 个细胞,培养12 h后,按下述处理继续培养:对照组只添加DMEM/F12培养基;TTO组添加0.05%TTO的DMEM/F12培养基;LPS组添加1 μ g/mL LPS的DMEM/F12培养基;LPS+TTO组添加1 μ g/mL LPS和0.05%TTO的DMEM/F12培养基,每组6个重复。培养24 h后,分别收集各组细胞,提取总RNA。总RNA提取参照Tiangen公司总RNA提取试剂盒说明书方法进行。反转录采用Roche公司反转录试剂盒合成cDNA,操作方法、反应体系和反应液配制参照本课题组占今舜等^[16]的报道。

每个样品3个重复,以磷酸甘油醛脱氢酶(*GAPDH*)作为内参基因。引物设计参照本课题组Gong等^[17]以及占今舜等^[16]研究报告,详见表1。基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算。

表1 引物序列及参数

Table 1 Primer sequences and parameters

基因 Genes	引物序列 Primer sequence (5'—3')	GenBank 登录号 GenBank accession No.	产物长度 Product length/bp
白细胞介素-1 β <i>IL-1β</i>	F: CAGTGCCTACGCACATGTCT R: AGAGGAGGTGGAGAGCCTTC	NM_174093.1	209
白细胞介素-6 <i>IL-6</i>	F: TCCTTGCTGCTTTCACACTC R: CACCCCAGGCAGACTACTTC	NM_173923.2	129
白细胞介素-8 <i>IL-8</i>	F: TGGGCCACACTGTGAAAAT R: TCATGGATCTTGCTTCTCAGC	NM_173925.2	136
肿瘤坏死因子- α <i>TNF-α</i>	F: GCCCTCTGGTTCAGACACTC R: AGATGAGGTAAAGCCCGTCA	NM_173966.3	192
Toll样受体-4 <i>TLR-4</i>	F: GACCCTTGCGTACAGGTTGT R: GGTCCAGCATCTTGTTGAT	NM_174198.6	103
磷酸甘油醛脱氢酶 <i>GPADH</i>	F: GGGTCATCATCTCTGCACCT R: GGTCCATAAGTCCCTCCACGA	NM_001034034.2	176

1.2.3 TTO 对 NF- κ B 通路的影响

将培养到一定密度的奶牛瘤胃上皮细胞收集于 6 孔板中,每孔 1×10^6 个细胞,培养 12 h 后,按 1.2.2 中的处理培养 24 h 后收集各组细胞,每组 6 个重复。提取蛋白及蛋白质印迹 (Western blot) 法参照本课题组詹康^[18] 研究报道。

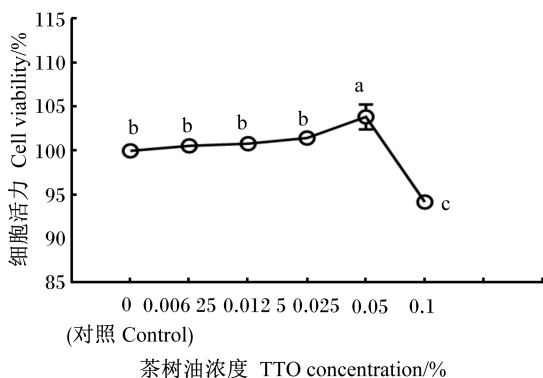
1.3 数据统计分析

运用 SPSS 16.0 统计软件中的 one-way ANOVA 模块进行单因素方差分析,LSD 法进行多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 TTO 对奶牛瘤胃上皮细胞毒性的影响

由图 1 可知,与对照组相比,添加 0.05% TTO 显著提高奶牛瘤胃上皮细胞活力 ($P < 0.05$); 添加 0.1% TTO 显著抑制奶牛瘤胃上皮细胞活力 ($P < 0.05$)。因此,选择 0.05% TTO 来研究其对 LPS 诱导的奶牛瘤胃上皮细胞炎症因子表达的影响。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 2 同。Different small letters mean significant difference ($P < 0.05$). The same as Fig.2.

图 1 TTO 对奶牛瘤胃上皮细胞毒性的影响

Fig.1 Effects of TTO on cytotoxicity in BRECs

2.2 TTO 对炎症细胞因子表达的影响

由图 2 可知,与对照组相比,LPS 组 $IL-1\beta$ 、 $IL-8$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $TLR-4$ 基因表达量显著增加 ($P < 0.05$);TTO 组 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $TLR-4$ 基因表达量显著下降 ($P < 0.05$)。

与 LPS 组相比,LPS + TTO 组 $IL-1\beta$ 、 $IL-8$ 、 $TLR-4$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 基因表达量显著下降 ($P < 0.05$)。

2.3 TTO 对 NF- κ B 信号通路的影响

由图 3 可知,与对照组相比,LPS 组可以提高 NF- κ B 信号通路 p65、p-p65 的蛋白表达量。与 LPS 组相比,LPS+TTO 组 NF- κ B 信号通路 p65、p-p65 的蛋白表达量降低。

3 讨论

SARA 是一种泌乳奶牛常见的疾病。瘤胃 pH 降至 5.6 以下且每天超过 3 h 是 SARA 的特征^[19]。当瘤胃 pH 较低时,革兰氏阴性菌裂解较快,增加了瘤胃内 LPS 的浓度^[20]。瘤胃上皮持续暴露在高浓度的 LPS 中会引起 SARA。Zhang 等^[7] 研究表明,LPS 可加剧 SARA 炎症的病情。已有研究证明 TTO 具有抗炎作用,但未有研究证明 TTO 对调控 SARA 引起瘤胃上皮炎症反应是否有影响。本试验结果表明,低浓度 TTO 对 LPS 诱导的奶牛瘤胃上皮细胞炎症因子具有抑制作用。

3.1 TTO 对奶牛瘤胃上皮细胞毒性的影响

据报道,人类中毒试验研究中 5% TTO 不会产生过敏反应,2.5% TTO 不会出现皮肤中毒,2% TTO 不会产生肝损伤^[21]。因此,低剂量的 TTO 不会产生不良反应。早期 Hayes 等^[22] 研究报道,0.005%~0.030% TTO 能够诱导黑色素肿瘤细胞半胱氨酸酶依赖性凋亡,能够明显抑制变异性细胞群。Ninomiya 等^[23] 用 TTO 治疗口腔念珠菌引起的感染,当 TTO 浓度为 900 μ g/mL 时可显著抑制白色念珠菌细胞巨噬细胞产生细胞因子。本试验结果显示,0.05% TTO 可以提高奶牛瘤胃上皮细胞活力,因此,低浓度的 TTO 对细胞无害。

3.2 TTO 对炎症细胞因子表达的影响

瘤胃炎症是 SRAR 直接引起的症状。TLR-4 是脂多糖的受体^[24],LPS 可以激活 TLR-4 并引发全身炎症。LPS 可以引起奶牛瘤胃上皮细胞的炎性损伤^[25]。Wang 等^[24] 研究表明,增多的 LPS 会激活奶牛乳腺上皮细胞表面的 TLR-4,增加炎症细胞因子的表达,并破坏乳腺上皮功能,最终导致全身炎症。重要的是,Zhang 等^[7] 发现,LPS 在体外刺激奶牛瘤胃上皮细胞可以显著的提高 $IL-1\beta$ 和 $IL-8$ mRNA 表达。这些研究表明,奶牛瘤胃上皮细胞能够对炎症细胞因子的释放做出反应。LPS 水平增加会导致一系列的免疫应答,如促炎细胞因子的产生和释放,包括 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和 $IL-6$ 等,LPS 诱导这些因子的释放对于激活免疫系

统,引起免疫应答具有重要的作用^[26]。因此本试验使用奶牛瘤胃上皮细胞探讨 TTO 体外抗炎的机制。本试验结果表明,LPS 诱导奶牛瘤胃上皮细胞可以显著提高炎症因子 *IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-8*、*TLR-4*

的基因表达量,但是低浓度 TTO 可以显著降低炎症细胞因子的表达量,因此 TTO 可以改善瘤胃上皮由 LPS 引发的炎症反应。

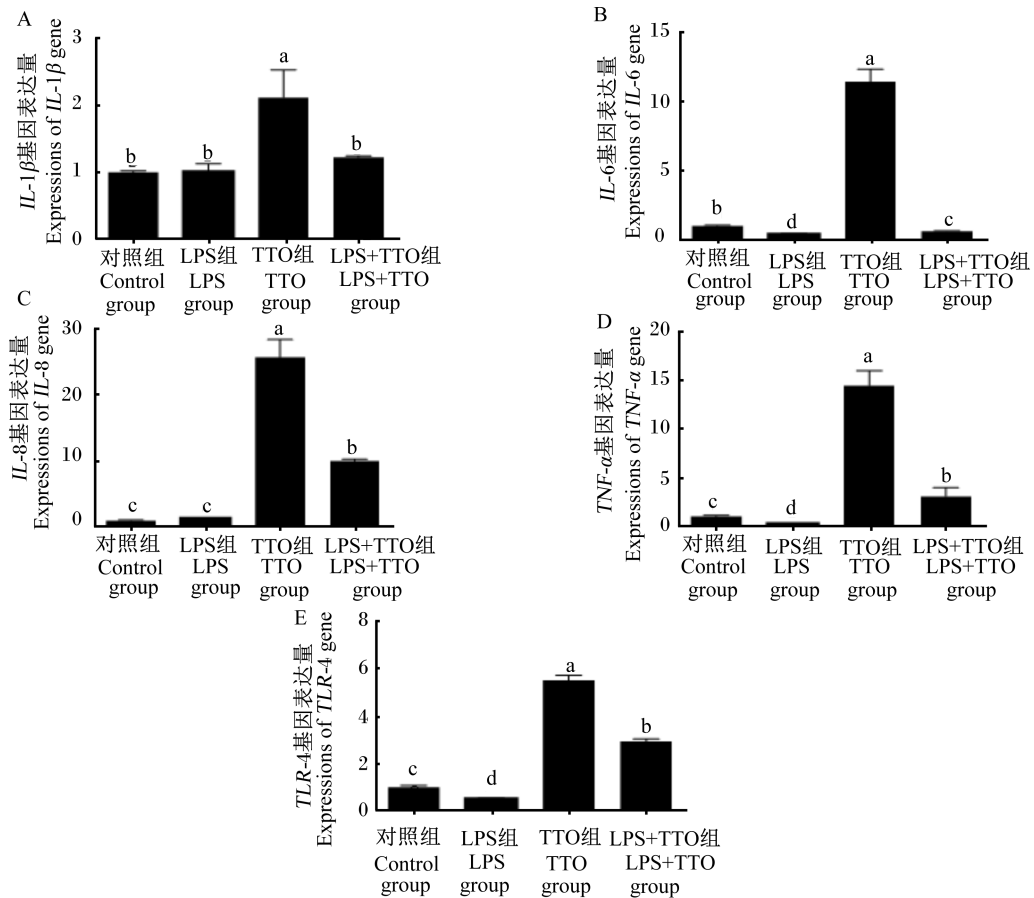


图2 TTO对奶牛瘤胃上皮细胞炎症细胞因子基因表达量的影响

Fig.2 Effects of TTO on expression of inflammatory cytokine genes in BRECs

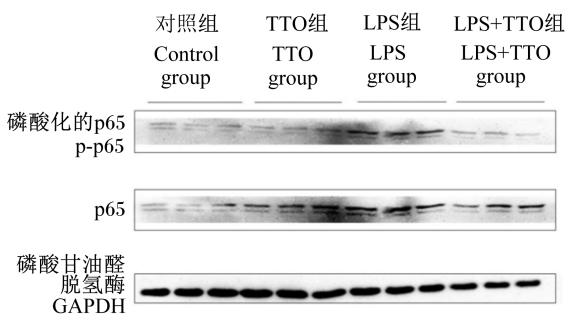


图3 TTO对奶牛瘤胃上皮细胞 NF- κ B 信号通路中 p65、p-p65 蛋白表达量的影响

Fig.3 Effects of TTO on expression levels of p65 and p-p65 protein in NF- κ B signaling pathway in BRECs

3.3 TTO对NF- κ B通路的影响

由于高精料饲喂过量可能导致SARA的发

生,致使瘤胃内营养物质过剩,导致瘤胃微生物大量繁殖,其代谢物可使 *TNF- α* 、*IL-1 β* 等炎症因子的表达量增加,并且 NF- κ B 信号通路激活后炎症因子进一步增加,从而加剧炎症反应^[27-29]。王婷婷^[30]研究表明,NF- κ B 蛋白的磷酸化和入核过程反映信号通路的传导抑制,可以增加转录因子 NF- κ B p65 的入核与转录活性,并进一步增加炎症细胞因子 *TNF- α* 、*IL-6* 和 *IL-1 β* 等的表达和与释放,从而引起瘤胃上皮细胞的炎症损伤。NF- κ B 信号通路参与许多组织炎症疾病的发病机制^[31]。Western Blot 结果表明,TTO 会降低 LPS 诱导奶牛瘤胃上皮细胞中的 p65 蛋白表达量,从而抑制奶牛瘤胃上皮细胞炎症因子的表达。

4 结 论

① 低浓度的 TTO 可以提高奶牛瘤胃上皮细胞的活力。

② 低浓度 TTO 对炎症因子 *IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-8*、*TNF- α* 和 *TLR-4* 的基因表达有显著抑制作用。

③ 低浓度 TTO 可以抑制 NF- κ B 信号通路 p65、p-p65 蛋白表达量,进而抑制促炎细胞因子表达。

参考文献:

- [1] PAN X H, YANG L, XUE F G, et al. Relationship between thiamine and subacute ruminal acidosis induced by a high-grain diet in dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99 (11) : 8790–8801.
- [2] ENEMARK J M D. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA) : a review [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176 (1) : 32–43.
- [3] PLAIZIER J C, KRAUSE D O, GOZHO G N, et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences [J]. *The Veterinary Journal*, 2008, 176 (1) : 21–31.
- [4] GOZHO G N, KRAUSE D O, PLAIZIER J C. Ruminant lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90 (2) : 856–866.
- [5] NYATI K K, KAZUYA M, ZAMAN M M U, et al. TLR4-induced NF- κ B and MAPK signaling regulate the *IL-6* mRNA stabilizing protein Arid5a [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45 (5) : 2687–2703.
- [6] WELLNITZ O, KERR D E. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 101 (3/4) : 191–202.
- [7] ZHANG R Y, ZHU W Y, MAO S Y. High-concentrate feeding upregulates the expression of inflammation-related genes in the ruminal epithelium of dairy cattle [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2016, 7 (1) : 42.
- [8] 刘博铭. 茶树油肺吸入制剂的研究 [D]. 硕士学位论文. 郑州: 河南大学, 2014.
- [9] CARSON C F, HAMMER K A, RILEY T V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006, 19 (1) : 50–62.
- [10] COX S D, MANN C M, MARKHAM J L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91 (3) : 492–497.
- [11] KESZEI A, HASSAN Y, FOLEY W J. A biochemical interpretation of terpene chemotypes in *Melaleuca alternifolia* [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2010, 36 (6) : 652–661.
- [12] SHELTON D, ZABARAS D, CHOCHAN S, et al. Isolation and partial characterisation of a putative monoterpene synthase from *Melaleuca alternifolia* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42 (11) : 875–882.
- [13] BRAND C, GRIMBALDESTON M A, GAMBLE J R, et al. Tea tree oil reduces the swelling associated with the efferent phase of a contact hypersensitivity response [J]. *Inflammation Research*, 2002, 51 (5) : 236–244.
- [14] BRAND C, TOWNLEY S L, FINLAY-JONES J J, et al. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears [J]. *Inflammation Research*, 2002, 51 (6) : 283–289.
- [15] NOGUEIRA M N M, AQUINO S G, ROSSA C, et al. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of *IL-1 β* , *IL-6* and *IL-10* on human macrophages [J]. *Inflammation Research*, 2014, 63 (9) : 769–778.
- [16] 占今舜, 谷德平, 胡利珍, 等. 苜蓿素对脂多糖刺激下体外培养奶牛乳腺上皮细胞活性和炎症相关基因表达的影响 [J]. *动物营养学报*, 2018, 30 (2) : 641–648.
- [17] GONG X X, SU X S, ZHAN K, et al. The protective effect of chlorogenic acid on bovine mammary epithelial cells and neutrophil function [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101 (11) : 10089–10097.
- [18] 詹康. SCFAs 通过 GPR41 调控奶牛瘤胃上皮细胞炎症反应的研究 [D]. 博士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [19] GOZHO G N, PLAIZIER J C, KRAUSE D O, et al. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response [J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88 (4) : 1399–1403.
- [20] KHAFIPOUR E, PLAIZIER J C, AIKMAN P C, et al. Population structure of rumen *Escherichia coli* associated with subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy

- cattle [J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94 (1) : 351-360.
- [21] HAMMER K A, CARSON C F, RILEY T V, et al. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44 (5) : 616-625.
- [22] HAYES A J, LEACH D N, MARKHAM J L, et al. *In vitro* cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines [J]. Journal of Essential Oil Research, 1997, 9(5) : 575-582.
- [23] NINOMIYA K, HAYAMA K, ISHIJIMA S A, et al. Suppression of inflammatory reactions by terpin-4-ol, a main constituent of tea tree oil, in a murine model of oral candidiasis and its suppressive activity to cytokine production of macrophages *in vitro* [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2013, 36(5) : 838-844.
- [24] WANG J F, ZHANG X, HE X J, et al. LPS-induced reduction of triglyceride synthesis and secretion in dairy cow mammary epithelial cells via decreased SREBP1 expression and activity [J]. Journal of Dairy Research, 2018, 85(4) : 439-444.
- [25] JANSSENS S, BEYAERT R. Role of toll-like receptors in pathogen recognition [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2003, 16(4) : 637-646.
- [26] 于子阳. 奶牛 SARA 相关内环境参数变化及黄连素对瘤胃上皮细胞炎症的影响 [D]. 硕士学位论文. 长春: 吉林大学, 2016.
- [27] WULLAERT A, BONNET M C, PASPARAKIS M. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation [J]. Cell Research, 2011, 21 (1) : 146-158.
- [28] 任建聪. AEBP1 通过 NF- κ B 通路促进腹主动脉瘤发生发展的研究 [D]. 博士学位论文. 沈阳: 中国医科大学, 2019.
- [29] BOULANGER D, BUREAU F, MÉLOTTE D, et al. Increased nuclear factor κ B activity in milk cells of mastitis-affected cows [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(4) : 1259-1267.
- [30] 王婷婷. 亚急性瘤胃酸中毒病牛瘤胃组胺对瘤胃上皮细胞炎症通路的影响 [D]. 硕士学位论文. 长春: 吉林大学, 2015.
- [31] TIAN M Y, FAN J H, ZHUANG Z W, et al. Effects of silymarin on p65 NF- κ B, p38 MAPK and CYP450 in LPS-induced hoof dermal inflammatory cells of dairy cow [J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15 (1) : 127.

Effects of Tea Tree Oil on Expression of Inflammatory Factors in Bovine Rumen Epithelial Cells Induced by Lipopolysaccharide

MA Xiaoyu^{1,2,3} PENG Cheng^{1,2,3} ZHAN Kang^{1,2,3} ZHAN Jinshun⁴ YANG Tianyu^{1,2,3}
NING Lili^{1,2,3} ZHAO Guoqi^{1,2,3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Institutes of Agricultural Science and Technology Development, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 3. Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-Product Safety of Ministry of Education of China, Yangzhou University Yangzhou 225009, China; 4. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effects of tea tree oil (TTO) on the expression of inflammatory factors in bovine rumen epithelial cells (BRECs) induced by lipopolysaccharide (LPS). The cell counting kit-8 (CCK-8) was used to determine the effects of different TTO concentrations [0 (control), 0.006 25%, 0.012 5%, 0.025%, 0.05% and 0.1% TTO] on the activity of BRECs and each concentration was performed six replicates. The concentration of 0.05% TTO was selected according to the above tests for subsequent experiments. Then, qRT-PCR and Western blot were used to investigate the changes of expression levels of inflammatory factors at gene and protein levels in BRECs. The experiment was divided into four groups: control group (CON group, without adding TTO and LPS), TTO group (only adding 0.05% TTO), LPS group (only adding 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS), LPS+TTO group (both adding 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS and 0.05% TTO). Each group was performed six replicates. The results showed as follows: 1) compared with the CON group, the cell viability of BRECs was significantly improved by adding 0.05% TTO ($P<0.05$) and was significantly inhibited by adding 0.1% TTO ($P<0.05$). 2) Compared with the CON group, the expression levels of interleukin (*IL*)-1 β , *IL*-6, *IL*-8, tumor necrosis factor- α (*TNF*- α) and Toll like receptor-4 (*TLR*-4) genes were significantly increased when LPS was added ($P<0.05$). Compared with LPS group, the expression levels of *IL*-1 β , *IL*-6, *IL*-8, *TNF*- α and *TLR*-4 genes were significantly decreased by adding TTO to LPS ($P<0.05$). 3) Compared with the CON group, LPS could increase the protein expression levels of p65 and p-p65 in nuclear factor- κB (NF- κB) pathway but adding both LPS and TTO could decrease the protein expression levels of p65 and p-p65. In summary, low concentration of TTO can enhance the activity of BRECs and inhibit the expression of proteins associated with inflammatory signaling pathway NF- κB induced by inflammation of BRECs which caused by LPS, and then can inhibit the production of proinflammatory factor. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(12):5903-5909]

Key words: tea tree oil; bovine rumen epithelial cells; NF- κB ; proinflammatory cytokine