

羟基酪醇对 LPS 引起的小鼠急性肺损伤的保护作用

Protective effect of hydroxytyrosol on LPS-induced acute lung injury in mice

魏静元

WEI Jing-yuan

(辽宁省分析科学研究院, 辽宁 沈阳 110015)

(Liaoning Province Academy of Analytic Sciences, Shenyang, Liaoning 110015, China)

摘要:探索了羟基酪醇通过调控自噬在小鼠 ALI 模型中发挥其抗炎作用的潜在分子机制。通过 Western 印迹和染色方法检测 LPS 诱导的 ALI 小鼠细胞因子活性、炎症因子水平、sirtuin(SIRT1/3/6)表达、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)激活和自噬标志物表达,用 Sybyl/Surfex 模块研究了 HT 与 SIRT 和 MAPK 之间的分子对接。结果显示,LPS 刺激的 SIRT 抑制、MAPK 磷酸化和自噬抑制均被 HT 给药显著消除。伴随着 BAL 液中肺 W/D 比值、蛋白质浓度和炎症细胞水平的降低,HT 治疗显著减弱肺水肿和炎症细胞浸润到肺组织中。包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 MCP-1 等炎症介质的 LPS 驱动释放,被 HT 强烈调控。

关键词:羟基酪醇;脂多糖;自噬;急性肺损伤;sirtuin 蛋白

Abstract: This paper explored the underlying molecular mechanisms by which hydroxytyrosol exerts its anti-inflammatory effects in a murine model of acute lung injury (ALI) by up-regulating autophagy. LPS-induced cytokine activity, inflammatory factor levels, sirtuin (SIRT1/3/6) expression, mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, and autophagy marker expression in ALI-mice were examined by western blotting and staining methods. Molecular docking between HT and SIRT and MAPK was studied with a Sybyl/Surfex module. The results showed that LPS-stimulated SIRT inhibition, MAPK phosphorylation, and autophagy suppression were all notably abolished by HT administration. HT treatment significantly attenuated pulmonary edema and inflammatory cell infiltration into lung tissues, accompanied by decreased lung W/D ratios, protein concentrations, and inflammatory cell levels in BAL fluid. LPS driven release of inflammatory mediators, including TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, and MCP-1, was strongly regulated by HT.

Keywords: Hydroxytyrosol; Lipopolysaccharide; Autophagy; acute lung injury; Sirtuin

羟基酪醇(hydroxytyrosol, HT),又名 3,4-二羟基苯乙醇,是一种天然抗氧化剂,广泛存在于橄榄科橄榄属植物的枝叶及果实中,是橄榄油的有效成分,其对急性肺损伤(ALI)自噬作用引起越来越多的关注。自噬是细胞蛋白质和细胞器自我降解的过程,已被发现参与不同的生理过程,包括炎症反应和组织损伤^[1]。已经证明,自噬缺陷的小鼠,腹腔腔内注射脂多糖(LPS)导致相对于对照小鼠更高水平的促炎细胞因子和高死亡率^[2]。此外,某些研究^[3-4]涉及一些 sirtuin 家族成员在炎症过程中发生的保护机制,最近已经开发了药理学方法通过靶向其活动来调节炎症。然而,确切的作用机制尚未得到充分阐述。

急性肺损伤(ALI)和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)与肺对感染性、炎性或化学损伤的一致反应有关,因此通常与全身性疾病如败血症或重大创伤相关^[5]。具体来说,肺是多发性传染病的常见目标,包括严重急性呼吸综合征(SARS)病毒或禽流感 AH5N1 病毒,两者都会导致因 ARDS 并发症而致无法接受的高死亡率^[6]。因此,ALI/ARDS 成了全球公共卫生的主要负担,导致医疗支出巨大,死亡率高达 30%~50%^[7]。在过去几十年中,尽管在支持性护理治疗方面有所改善,但尚未开发出具体针对 ALI/ARDS 的药物治疗方案^[5,8]。

含有大量橄榄油的地中海饮食与心血管疾病和某些癌症的较低发病率相关^[9]。在这些橄榄油酚中,具有生物活性的酚类化合物,如羟基酪醇(HT)被认为是最丰富和最具有代表性的多酚^[10-11]。最近的几项研究表明,HT 具有抗氧化^[12]、抗炎^[13]和抗菌^[14]活性。同时,研究表明,HT 没有毒性^[15],是商业上可用的食品和营养补充剂^[10,15]。此外,HT 的抗炎功效也已在体外和体内广泛研究和阐明^[14]。然而,HT 对感染性肺损伤和炎症反应(如 ALI/ARDS 中所见)的影响尚未完全了解。

本研究的目的是评估 HT 对减少炎症、促进自噬和激活 SIRT 的作用,并将这些作用与地塞米松(DXM)进行比较。

基金项目:辽宁省自然科学基金(编号:20170540480)

作者简介:魏静元(1971—),男,辽宁省分析科学研究院副研究员,博士。E-mail:906017405@qq.com

收稿日期:2017-04-31

1 材料与方法

1.1 试剂

HT:纯度>98%,西安应化生物科技公司;
脂多糖(LPS,大肠杆菌 O111:B4):美国 Sigma-Aldrich 公司;
地塞米松(DXM):纯度>99.6%,美国 Sigma-Aldrich 公司;
小鼠白介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-10 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒:美国 Biolegend 公司;
丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)家族抗体(包括 ERK、JNK 和 p38)、小鼠 β -肌动蛋白单克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗小鼠和兔 IgG(磷酸化和非磷酸化)(H+L)二抗:美国 ABclonal Biotech 有限公司;
LC3、Beclin-1 和 SIRT3 一抗:美国 Cell Signaling Technology 公司;
SIRT1 一抗、SIRT6 一抗:英国 Abcam 公司;
单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)一抗:美国 NOVUS Biologicals 公司;
其他化学试剂:分析纯,碧云天生物科技有限公司。

1.2 试验设计

BALB/c 小鼠:雄性,6 周龄,体重约 20 g,中国医科大学实验动物中心。实验室温度(24 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 60%。将小鼠饲养在具有过滤空气、高压灭菌木床、食物和水的灭菌微型隔离器笼中。所有的试验程序按照实验室动物福利指南操作。在试验期间没有小鼠死亡,没有明显的疲惫迹象。
1.2.1 LPS 刺激方案 小鼠随机分为 4 组。在 LPS 攻击前 1 h 给予相应的药物或生理盐水处理。在 LPS 滴注后 24 h 处死小鼠。

- (1) 对照组:生理盐水,每只小鼠 0.2 mL,灌胃。
- (2) LPS 组:每只小鼠 10 μg ,鼻内^[16]。
- (3) HT + LPS 组:HT,100 mg/kg,灌胃;LPS,每只小鼠 10 μg ,鼻内^[17]。
- (4) DXM + LPS 组:DXM,5 mg/kg,灌胃;LPS,每只小鼠 10 μg ,鼻内^[17]。

1.2.2 药品管理 每次在相应的 LPS 攻击前 1 h,灌胃小鼠生理盐水(每只小鼠 0.2 mL)或 HT(100 mg/kg,溶于生理盐水)。DXM 是一种合成的肾上腺皮质激素,用于治疗各种炎性疾病。因此,在本研究中,DXM(5 mg/kg,溶于生理盐水,灌胃)作为阳性对照。

1.3 方法

1.3.1 支气管肺泡灌洗(BAL)液收集和肺组织分离 最后一次攻击 24 h 后,将小鼠麻醉并进行气管切开术。通过具有 0.5 mL 高压灭菌的 PBS(pH=7.2)的气管插管进行 BAL 液的 3 次收集,总体积约 1.3 mL,流体的回收率约为 87%。将收集的 BAL 液体样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 700 $\times g$ 离心 10 min,并将上清液在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻以进一步做 ELISA,然后将细胞沉淀物处理并用作炎症细胞分析的样品。从未进行 BAL 液收集的小鼠中同时收获肺组织,然后用优化切割温度

(O.C.T.)化合物或-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存做进一步试验,包括 western 印迹分析、形态学研究和免疫组织化学染色。

1.3.2 支气管肺泡灌洗(BAL)液分析

(1) BAL 液的细胞分类计数:将细胞沉淀再次悬浮于 1 mL 红细胞裂解缓冲液中,以除去红细胞。随后,4 $^{\circ}\text{C}$,700 $\times g$ 离心 10 min 将白细胞分离。然后,将这些白细胞沉淀再次悬浮于 1.0 mL PBS(pH=7.2)中,并使用 KWIK-DIF-FTM 染色试剂盒(Thermo Fisher Scientific Inc)进行染色。每个样品总共 200 个细胞用于细胞分类计数,包括用血细胞计数器手工计算的淋巴细胞和嗜中性粒细胞。

(2) 细胞因子和趋化因子的测量:每个样品的浓度一式两份测定。根据制造商的说明书,使用 ELISA 试剂盒测量 BAL 液样品中细胞因子的含量,包括 IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 。

1.3.3 肺免疫组织化学和组织学染色 对于组织病理学评估,分离未经 BAL 的小鼠的肺组织,4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定于 4%多聚甲醛中 24 h,PBS 中洗涤后,4 $^{\circ}\text{C}$ 下在 30%蔗糖中温育过夜,然后嵌入 O.C.T. 化合物并在-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻。

7 μm 厚的连续冰冻切片和一抗 MCP-1(PBS 1:2 000 稀释)进行免疫组化孵育。二抗是用于 MCP-1 染色的抗鼠 IgG。此外,组织切片用苏木精和伊红(H&E)染色用于炎症细胞浸润。显微照片被裁剪并校正了亮度和对比度,但没有进行其他操作。进行肺切片炎症细胞浸润和黏液产生的半定量分析时^[18],为了确定炎性细胞浸润的严重程度,以盲法评估支气管细胞计数,并在 5 分评分系统上评分:0,无细胞;1,几个细胞;2,细胞环 1 个细胞层深;3,细胞环 2~4 个细胞深;4,细胞环超过 4 个细胞深。为了确定黏液生成的大小,使用 5 点分级系统以盲法定量气道上皮中的杯状细胞增生:0,无杯状细胞;1,25%;2,25%~50%;3,50%~75%;4,75%。每个肺段至少在 3 个不同的区域进行炎症细胞和杯状细胞的评分。

1.3.4 分子对接 进行对接研究以探索 HT 与 SIRT 和 MAPK 的潜在结合模式。它们使用 Sybyl 程序包(X 版)构建,使用鲍威尔方法(Powell's method)优化,具有几个收敛标准(kJ/mol/nm)的三重力场,并使用 Gasteiger-Hückel 方法^[16]。对接研究使用 Sybyl / Surflex 模块进行;SIRT1 周围不同半径内残留物(PDB ID:4I5I 在 0.250 nm 处分解)、SIRT3(用 PDB ID:3GLS 在 0.270 nm 处分解)、ERK(用 PDB ID:4QYY 解析为 0.165 nm)、JNK(0.179 nm 与 PDB ID:5AWM)和 p38(在 0.230 nm,PDB ID:2YIX 解析)定义为活性位点。Surflex-Dock 程序用于具有默认参数的对接计算,产生的莫尔卡德表面(Molcad surfaces)以观察对接的蛋白质-配体复合物的结合模式。

1.3.5 蛋白质印迹(Western blotting) 将肺组织加入到 Western 和 IP 的细胞裂解缓冲液中,分别按照制造商的说明书在蛋白酶和磷酸酶抑制剂的冰上均质化。将匀浆在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 14 000 $\times g$ 离心 10 min,除去小部分的蛋白质质量外,上清液分装储存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 。根据制造商的方案,使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白质浓度。在免疫印迹的每个泳道

中加载等量的 80 μg 蛋白质,通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,然后转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上。

用含 0.1% Tween-20(TBST)的 Tris 缓冲盐水洗涤后,用一抗检测免疫印迹。通过使用过氧化物酶缀合的二级抗小鼠或抗兔抗体再次洗涤 3 次后,使用增强型化学发光试剂盒开发结合的抗体。使用预定分子量标准作为标记。

1.4 统计分析

使用 SPSS 软件(版本 13.0)进行数据分析,并以平均值 $\pm$ SEM 表示。组间比较采用单因素方差分析或 t 检验。生存日期由 Kaplan-Meier 文本呈现,并通过对数秩和检验进行比较。 $\#P<0.05$ 或 $\#\#P<0.01$,相对于对照组; $*P<0.05$ 或 $**P<0.01$,相对于 LPS 组;方差分析,使用 Tukey-Kramer HSD 比较所有组对。

2 结果与分析

2.1 羟基酪醇对促炎细胞因子和趋化因子水平的影响

由图 1 可知,HT(100 mg/kg)和 DXM(5 mg/kg)的治疗有效地影响 BAL 液中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 和 IL-10 的分泌($P<0.01$)。进一步观察 HT 对 MCP-1 在小鼠肺组织中的表达的影响见图 2。与模型小鼠相比,HT 处理降低了 MCP-1

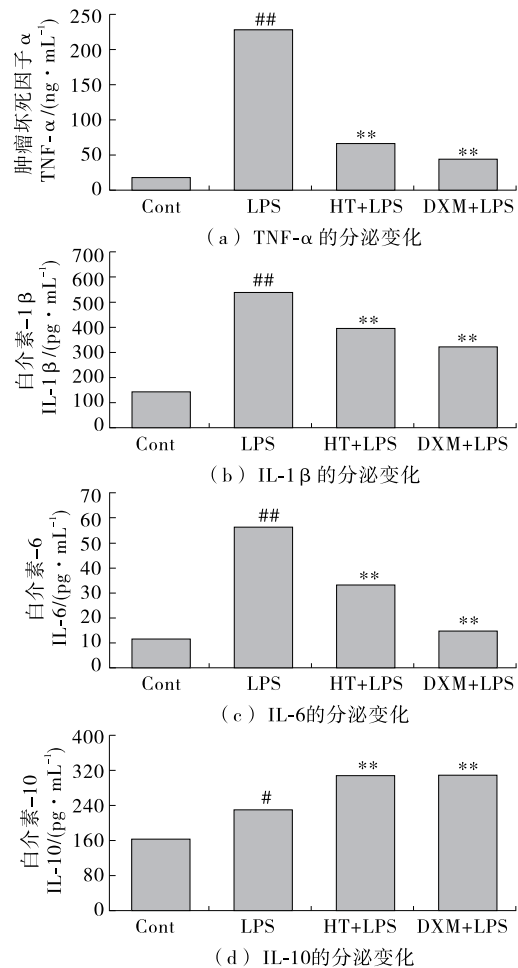


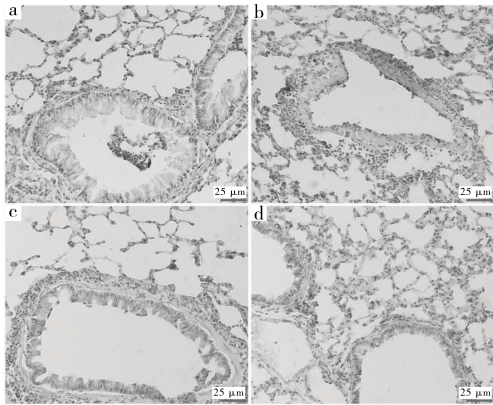
图 1 HT 对 BAL 液评估的影响

Figure 1 Effect of HT on BAL fluid assessments

在肺组织中的表达。此外,HT 在 100 mg/kg 的调节作用与 5 mg/kg DXM 的相当。说明 HT 对肺部炎症的调节作用可能与 Th1/Th2 细胞因子平衡有关。

2.2 羟基酪醇对 BAL 液中肺炎症细胞积累的影响

越来越多的证据^[2,19-20]表明,LPS 刺激白细胞聚集到炎症部位并导致随后的全身炎症。由图 3 可知,与生理盐水处理组相比,暴露于 LPS 的 BAL 液中的白细胞水平显著升高($P<0.01$)。与 LPS 组相比,用 HT 预处理显著抑制 LPS 诱



(a) 对照组 (b) LPS 组 (c) HT+LPS 组 (d) DXM+LPS 组
在 LPS 攻击后 24 h,取出肺组织并包埋 in 最佳切割温度(O.C.T.)化合物中。对于 MCP-1,一抗稀释度为 1/2 000,对 7 μm 厚度连续冷冻切片进行免疫染色。重复试验 3 次,得到类似的结果

图 2 HT 对肺内 MCP-1 表达的影响

Figure 2 Effect of HT on MCP-1 expression in lungs

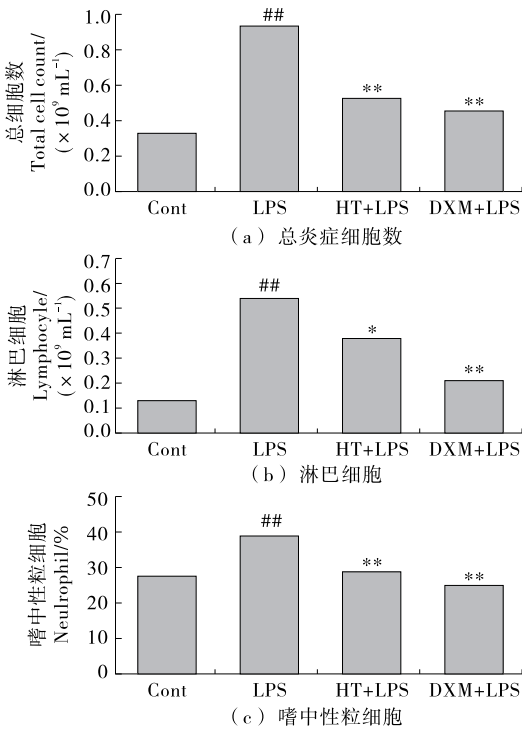


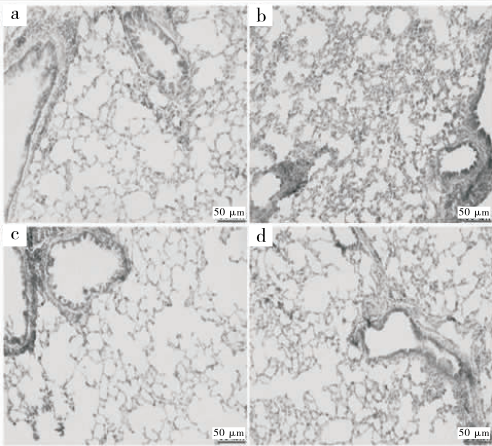
图 3 通过 Kwik-Diff 染色,HT 对 BAL 液中炎症细胞募集的影响

Figure 3 Effect of HT on recruitment of inflammatory cells in BAL fluid by Kwik-Diff staining

导的总炎症细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。此外,100 mg/kg 的HT 抑制与 5 mg/kg 的 DXM (与 DXM+LPS 组相比, $P>0.05$)相当。

2.3 羟基酪醇对 ALI 小鼠组织病理学改变的影响

由图 4 可知,苏木精-伊红染色显示,在没有 HT 预处理的情况下,LPS 施用 24 h 后对肺部造成广泛的形态学损伤,其表现为充血、水肿、白细胞聚集、增加肺泡间隔厚度,甚至肺泡塌陷。试验表明,在 HT+LPS 组中,LPS 攻击引起的病理症状得到改善。此外,在 HT 和 DXM 治疗组之间没有观察到组织病理学染色的显著差异。全肺炎症被定义为支气管炎炎症评分的平均值见图 5(a)。这些染色特征表明 HT 对 LPS 诱导的肺组织损伤具有保护作用。



(a) 对照组 (b) LPS 组 (c) HT+LPS 组 (d) DXM+LPS 组
图 4 HT 对肺组织病理学变化的影响
Figure 4 Effect of HT on histopathological changes of lungs

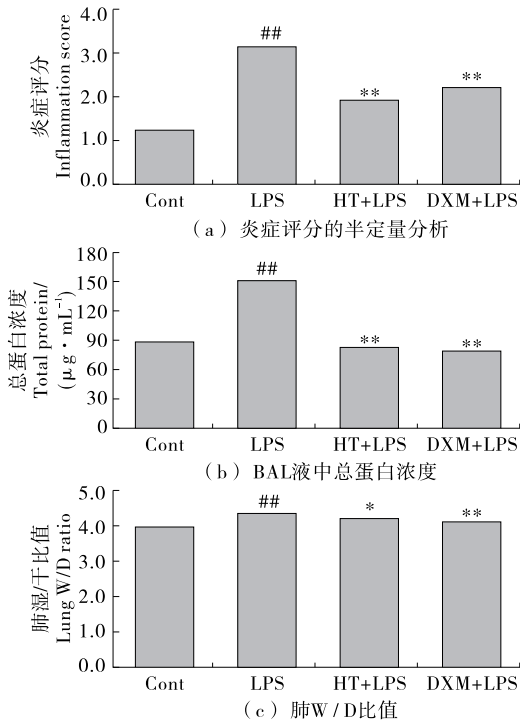


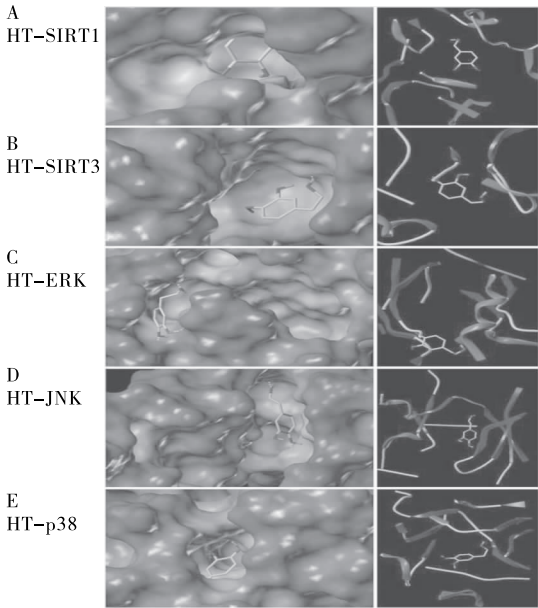
图 5 HT 对肺组织生理学变化的影响
Figure 5 Effect of HT on the Physiological Changes of Lungs

2.4 羟基酪醇对 LPS 诱导的肺水肿和血管通透性变化的影响

BAL 液中的总蛋白含量作为肺血管通透性的体内测量。由图 5(b)可知,与生理盐水组相比,LPS 单独处理显著增加 BAL 液中总蛋白浓度($P<0.01$),而用 HT 治疗可显著抑制肺部蛋白渗漏($P<0.01$)。此外,由图 5(c)可知,LPS 刺激后肺湿/干比率与对照组相比大幅增加($P<0.01$)。然而,在 LPS 攻击前 1 h 施用 HT(100 mg/kg)其增幅显著降低($P<0.05$)。

2.5 羟基酪醇对对接研究的影响

HT 在 SIRT1、SIRT3、ERK、JNK 和 p38 的活性位点的对接显示了 HT 与这些受体的氨基酸残基之间的许多 H 键相互作用,见图 6。与 HT 复合物中的 SIRT 和 MAPKs 的虚拟对接还显示 HT 与这些受体的活性位点紧密结合。结果表明,HT 的活性成分可以通过 SIRT 和/或 MAPK 的信号传导途径发挥作用。



右侧为 SIRT 和 MAPK 中 HT 的最佳对接姿态;左侧为带状结构描绘的相互结合作用
图 6 各个活动位点的 HT 的 FlexX 对接构象
Figure 6 FlexX docked conformation of HT in the active sites

2.6 羟基酪醇对 SIRT 表达和 MAPK 激活的影响

为了确定 HT 对自噬的阳性效应是否与 SIRT 和/或 MAPK 信号通路相关,进一步检查了 sirtuin 家族成员的蛋白质表达(见图 7)。结果表明,与 LPS 组相比,HT 治疗显著上调了所有这些 SIRT 的蛋白水平。另外,通过施用 HT, LPS 处理组中磷酸化 MAPKs(ERK、JNK 和 p38)水平的升高被显著破坏(见图 8)。5 mg/kg 的 DXM 导致具有 ALI 的小鼠中 SIRT 和 MAPK 活性的可比变化。结果表明,HT 对自噬的有益作用可能部分由 SIRT 和/或 MAPK 途径介导。

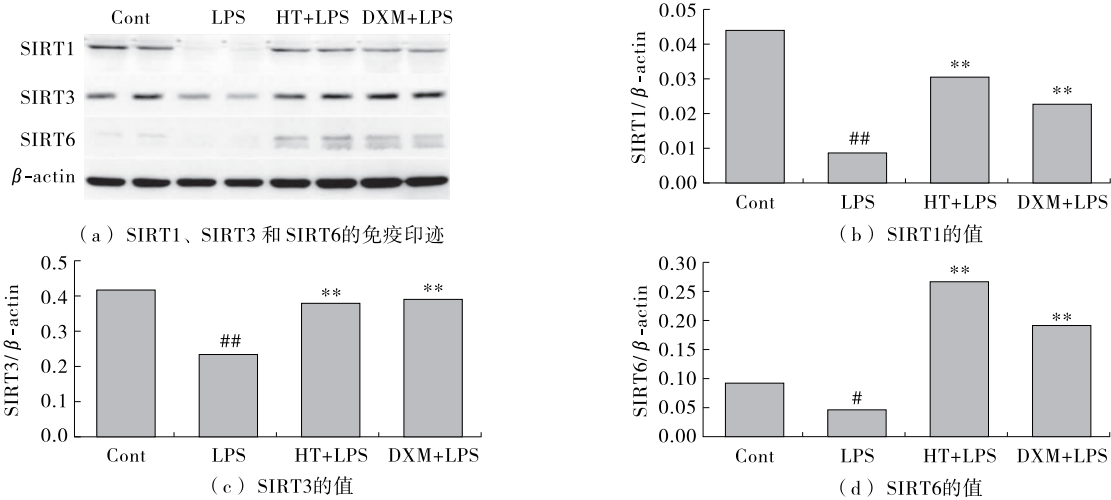


图 7 HT 对 LPS 诱导的 SIRT 表达的影响

Figure 7 Effect of HT on LPS-induced SIRT expression

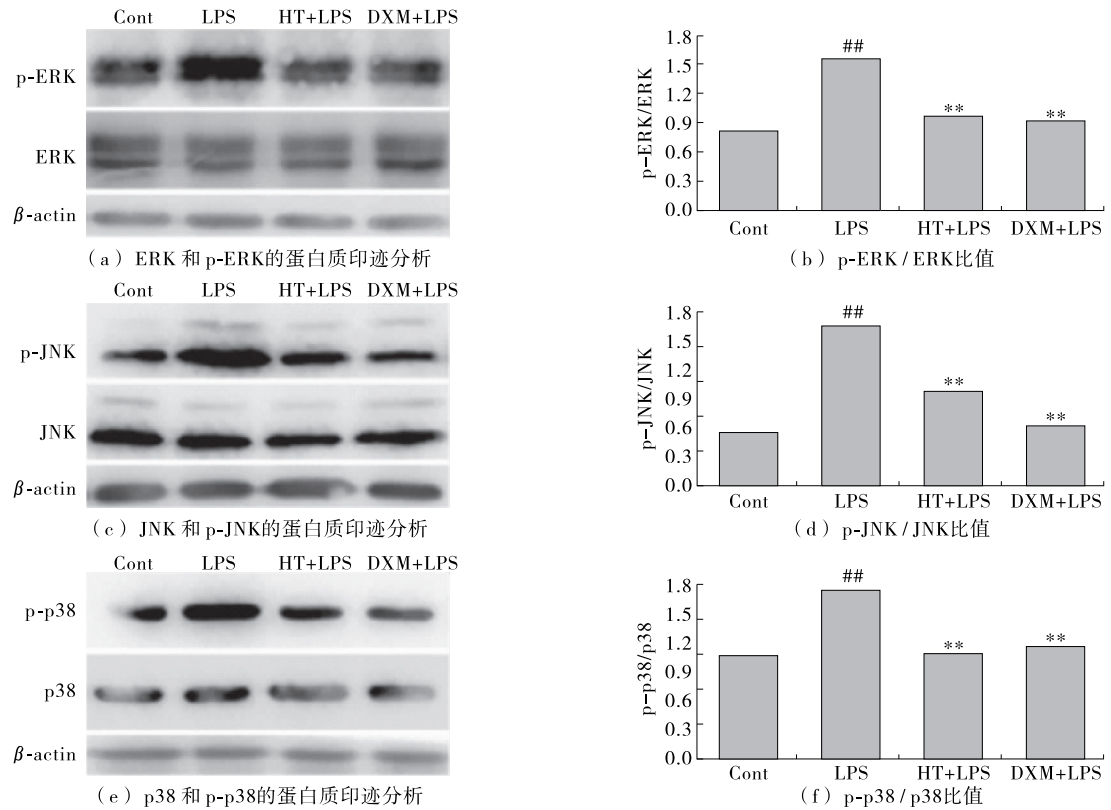


图 8 HT 对 LPS 诱导的 MAPK 激活的影响

Figure 8 Effect of HT on LPS-induced MAPK activation

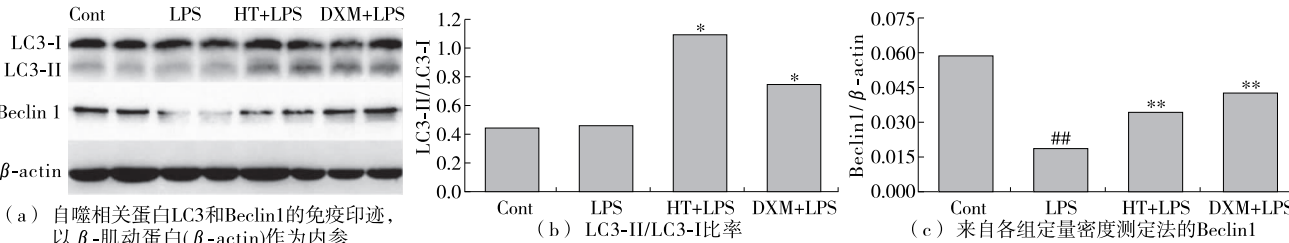


图 9 HT 对 LPS 诱导自噬的促进作用

Figure 9 Effect of HT on LPS-induced promotion of autophagy

2.7 羟基酪醇对肺组织自噬的影响

为了确定在 LPS 暴露的小鼠中是否可以通过 HT 处理诱导自噬,研究了 LC3-II 与 LC3-I 的比例(被认为是自噬的准确指标)。由图 9 可知,与 LPS 组相比,HT 给药增加了 LC3-II 与 LC3-I 的比例。此外,LPS 攻击显著抑制了 ALI 的肺中 Beclin1 蛋白表达的基础水平,而 HT 和 DXM 治疗基本上逆转了这种抑制。表明 HT 促进 ALI 小鼠肺部自噬。

3 结论

近年对 HT 潜在机制的研究侧重于其抗炎活性^[21-23],本研究探索了其通过调控自噬在小鼠 ALI 模型中发挥抗炎作用的潜在分子机制。HT 给药后显著消除了 LPS 刺激所致的 SIRT 抑制、MAPK 磷酸化和自噬抑制,增加了肺组织的自噬水平,并且伴随着 MAPK 的信号失活。而且,HT 给药后显著减弱了肺水肿和炎症细胞浸润到肺组织中,明显表现即 BAL 液中肺 W/D 比值、蛋白质浓度和炎症细胞水平的降低。此外,HT 治疗强烈调控了包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 MCP-1 等炎症介质的释放,表明 HT 可能是治疗 ALI/ARDS 的有希望的候选者。

参考文献

[1] UNUMA K, AKI T, FUNAKOSHI T, et al. Extrusion of mitochondrial contents from lipopolysaccharide-stimulated cells: Involvement of autophagy[J]. Autophagy, 2015, 11(9): 1 520-1 536.

[2] ABDEL F E, BHATTACHARYA A, HERRON A, et al. Critical role for IL-18 in spontaneous lung inflammation caused by autophagy deficiency[J]. J. Immunol, 2015, 194(11): 5 407-5 416.

[3] STORKA A, FÜHRLINGER G, SEPER M, et al. E. coli endotoxin modulates the expression of Sirtuin proteins in PBMC in humans[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2 013: 876943.

[4] JÉRÔME Lugrin, ELEONORA Ciarlo, ALBA Santos, et al. The sirtuin inhibitor cambinol impairs MAPK signaling, inhibits inflammatory and innate immune responses and protects from septic shock[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1 833(6): 1 498-1 510.

[5] MANIATIS N A, KOTANIDOU A, CATRAVAS J D, et al. Endothelial pathomechanisms in acute lung injury[J]. Vascul Pharmacol,2008, 49(4/5/6): 119-133.

[6] LEE N, HUI D, WU A , et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1 986-1 994.

[7] MATTHAY MA, GOOLAERTS A, HOWARD JP, et al. Mesenchymal stem cells for acute lung injury: preclinical evidence [J]. Crit Care Med, 2010, 38(10 Suppl): S569-573.

[8] CRIBBS S K, MATTHAY M A, MARTIN G S. Stem cells in sepsis and acute lung injury[J]. Crit Care Med, 2010, 38(12): 2 379-2 385.

[9] FENG Zhi-hui, BAI Li-yuan, YAN Jiong, et al. Mitochondrial dynamic remodeling in strenuous exercise-induced muscle and mitochondrial dysfunction: regulatory effects of hydroxytyrosol

[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(10): 1 437-1 446.

[10] SERGIO Granados-Principal, QUILES José L, RAMIREZ-TORTOSA Cesar L, et al. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials[J]. Nutr Rev, 2010, 68 (4): 191-206.

[11] SÁNCHEZ-FIDALGO S, IBARGÜEN L S D, CÁRDENO A, et al. Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model[J]. Eur J Nutr, 2012, 51(4): 497-506.

[12] WARLETA Fernando, QUESADA Cristina, CAMPOS Maria, et al. Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells[J]. Nutrients, 2011, 3(10): 839-857.

[13] BITLER C M, VIALE T M, DAMAJ B, et al. Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti-inflammatory activity [J]. J Nutr, 2005, 135(6): 1 475-1 479.

[14] TUCK K L, HAYBALL P J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects[J]. J Nutr Biochem, 2002, 13(11): 636-644.

[15] TAKEDA Y, BUI V N, IWASAKI K, et al. Influence of olive-derived hydroxytyrosol on the toll-like receptor 4-dependent inflammatory response of mouse peritoneal macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(4): 1 225-1 230.

[16] MOU Jia-jia, FANG Hao, JING Fan-bo, et al. Design, synthesis and primary activity evaluation of L-arginine derivatives as amino-peptidase N/CD13 inhibitors[J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(13): 4 666-4 673.

[17] HAO Jie-jie, SHEN Wei-li, YU Guang-li, et al. Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes[J]. J Nutr Biochem, 2010, 21 (7): 634-644.

[18] ORTEGA R. Importance of functional foods in the Mediterranean diet[J]. Public Health Nutr, 2006, 9(8A): 1 136-1 140.

[19] HUBER M, KALIS C, KECK S, et al. R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells[J]. Eur J Immunol, 2006, 36(3): 701-711.

[20] YIN H, LI X Y, YUAN B H, et al. Adenovirus-mediated overexpression of soluble ST2 provides a protective effect on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. Clin Exp Immunol, 2011, 164(2): 248-255.

[21] LAMY S, BEN S A, ZGHEIB A, et al. Olive oil compounds inhibit the paracrine regulation of TNF-alpha-induced endothelial cell migration through reduced glioblastoma cell cyclooxygenase-2 expression [J]. J Nutr Biochem, 2016, 27: 136-145.

[22] CABRERIZO S, CRUZ Jpdl, LÓPEZ-VILLODRES J A, et al. Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation[J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(12): 2 152-2 157.

[23] SCODITTI E, NESTOLA A, MASSARO M, et al. Hydroxytyrosol suppresses MMP-9 and COX-2 activity and expression in activated human monocytes via PKCalpha and PKCbeta1 inhibition[J]. Atherosclerosis, 2014, 232(1): 17-24.