

## 【实验研究】

## 基于Nrf2/HO-1信号通路研究橄榄苦苷的体外抗炎作用

韩 珊<sup>1,2</sup>, 王琴琴<sup>1,2</sup>, 李新星<sup>1,2</sup>, 高红伟<sup>1,2\*</sup>, 许琼明<sup>1,3</sup>, 杨世林<sup>1,2</sup>

1. 广西中医药大学 药学院, 广西 南宁 530020

2. 广西优势中成药与民族药开发工程技术中心, 广西 南宁 530020

3. 苏州大学 药学院, 江苏 苏州 215123

**摘 要:**目的 探讨橄榄苦苷对脂多糖(LPS)诱导的小鼠腹腔巨噬细胞(RAW264.7)炎症的保护作用及机制。方法 MTT法检测橄榄苦苷(0、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ )对RAW264.7细胞活性的影响;用橄榄苦苷(10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ )预处理细胞1 h后, LPS诱导炎症模型, Griess试剂检测细胞内Nitrite释放; Western blotting方法检测细胞iNOS、COX-2、Nrf2、Keap-1、HO-1、NQO1蛋白表达水平;流式细胞仪检测细胞内NO、ROS、 $\text{Ca}^{2+}$ 的水平;荧光显微镜检测线粒体膜电位(MMP)水平;ELISA法检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6)的释放。结果 与模型组比较, 橄榄苦苷组Nitrite释放水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), iNOS、COX-2蛋白的表达显著降低 ( $P < 0.001$ ), NO的产生显著减少 ( $P < 0.05$ 、0.01); TNF- $\alpha$ 、IL-6的释放受到显著抑制 ( $P < 0.001$ );  $\text{Ca}^{2+}$ 释放受到显著抑制 ( $P < 0.01$ ); ROS生成受到显著抑制 ( $P < 0.01$ ); JC-1单体降低, 恢复聚合物状态(红色荧光变多), MMP稳定性增强; Keap1蛋白表达显著降低, Nrf2、HO-1、NQO1蛋白的表达均显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结论 橄榄苦苷对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症具有抑制作用, 其作用机制可能与激活Nrf2/HO-1信号通路相关。

**关键词:** 橄榄苦苷; 抗炎; RAW264.7; Nrf2/HO-1信号通路

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2020) 02-0193-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.004

Oleuropein exerts anti-inflammatory effect *in vitro* via Nrf2/HO-1 signaling pathwayHAN Shan<sup>1,2</sup>, WANG Qinqin<sup>1,2</sup>, LI Xinxing<sup>1,2</sup>, GAO Hongwei<sup>1,2</sup>, XU Qiongmeng<sup>1,3</sup>, YANG Shilin<sup>1,2</sup>

1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530020, China

2. Guangxi Engineering Technology Research Center of Advantage Chinese Patent Drug and Ethnic Drug Development, Nanning 530020, China

3. College of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123, China

**Abstract: Objective** To explore the anti-inflammatory activity of Oleuropein in LPS-stimulated RAW264.7 cells via Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Methods** MTT method was used to detect the effect of oleuropein (0, 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) on the activity of RAW264.7 cells. After being pretreated with oleuropein (10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) for one hour, LPS induced inflammation model was established. Griess reagent was used to detect the release of nitrite in cells. Western blotting method was used to detect the expression of iNOS, COX-2, Nrf2, keap-1, HO-1 and NQO1 in cells. Flow cytometry was used to detect the expression of NO, ROS, and  $\text{Ca}^{2+}$  in cells. The levels of MMP, TNF -  $\alpha$  and IL-6 in supernatant were detected by ELISA. **Results** Compared with model group, the release level of nitrite in the oleuropein group decreased significantly ( $P < 0.05$ , 0.01, 0.001), the expression of iNOS and COX-2 decreased significantly ( $P < 0.001$ ), the production of NO decreased significantly ( $P < 0.05$ , 0.01), the release of TNF -  $\alpha$  and IL-6 was inhibited significantly ( $P < 0.001$ ), and the release of  $\text{Ca}^{2+}$  was inhibited significantly ( $P < 0.01$ ); ROS production was

收稿日期: 2019-09-23

**基金项目:** 国家青年科学自然科学基金项目(81803807); 广西壮族自治区青年科学基金项目(2018JJB140265); 广西高校引进海外高层次人才“百人计划”项目(05018064); 广西科技基地和人才专项(2018AD19034)。**第一作者:** 韩 珊, 广西中医药大学硕士研究生。**\*通信作者:** 高红伟, 博士, 研究方向为中药抗炎活性及抗肿瘤活性研究。Tel: 18077022216 E-mail: gaohongwei06@126.com

significantly inhibited ( $P < 0.01$ ); JC-1 monomer decreased, polymer state was restored (more red fluorescence), MMP stability was enhanced; Keap1 protein expression was significantly decreased, Nrf2, HO-1, NQO1 protein expression were significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$  and  $0.001$ ). **Conclusion** Oleuropein has a significant inhibitory effect on LPS-induced RAW264.7 cells inflammatory response, which reduces the inflammatory process by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

**Key words:** Oleuropein; anti-inflammation; RAW264.7; Nrf2/HO-1 signaling pathway

炎症反应是身体对外部有害因素的一种自我防御,但过度的炎症会导致一系列进行性人类疾病,如心血管疾病、癌症、哮喘过敏、阿尔茨海默病、溃疡性结肠炎和炎症性肠病等<sup>[1]</sup>。巨噬细胞是一种重要的免疫细胞,参与炎症反应的多种生理过程,产生多种促炎介质如一氧化氮(NO)、诱导一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素6(IL-6)等。据报道,这些促炎介质参与了炎症性疾病的发病机制<sup>[2]</sup>。炎症反应作为一些疾病的发病基础,严重影响了人类的生活质量和生命健康,因此加强炎症治疗相关的研究,筛选新的有效的抗炎药物,具有十分重要的意义。

广西毛冬青 *Ilex pubescens* var. *kwangsiensis* 是一种常绿小乔木或灌木,为本属植物毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. et Arn. var. 的变种,化学成分复杂,其主要的化学成分有三萜及其皂苷类、黄酮及其苷类、半萜苷类、萜类、木脂素及其苷类、生物碱类等<sup>[3]</sup>。国内外研究学者对冬青属植物的药理药效研究主要集中在黄酮及其苷类化合物、三萜及其皂苷类化合物,但对该属中环烯醚萜类及其苷类成分的抗炎活性研究不是很多。橄榄苦苷是从毛冬青的干燥根分离得到一种环烯醚萜类化合物。有研究表明,橄榄苦苷对四氯化碳所致小鼠肝损伤有肝保护作用,可降低 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  等细胞因子水平,还能通过抑制脂质氧化酶的活性和白三烯 B4 的产生达到抗炎的作用<sup>[4-5]</sup>,但橄榄苦苷对炎症反应作用的确切的药理机制尚未阐明,需进一步深入研究。

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)是通过 Abelson 鼠白血病病毒诱导 BALB/c 小鼠产生肿瘤后得到的细胞株,是一种在医学研究中应用十分普遍的巨噬细胞。巨噬细胞可以将抗原传递到 T 细胞,通过释放促炎细胞因子,如 IL-6、TNF- $\alpha$ 、活性氧(ROS)和 NO 等引发炎症<sup>[6]</sup>。血红素氧合酶-1(HO-1)、NADPH 醌氧化还原酶(NQO1)是受到核因子相关因子 2(Nrf2)调控的抗氧化酶,能够催化体内多种代谢途径来发挥抗氧化作用。HO-1 作为一种响应氧化应激的抗氧化酶,能够催化血红素降解为一氧化碳(CO)、铁和胆绿素。血红素的 CO、

铁、胆绿素等分解代谢产物中,胆绿素转换的 CO 和胆红素分别具有抗炎和抗氧化作用。有报道称,缺乏 HO-1 的动物模型表现出慢性炎症,而 HO-1 的表达则抑制了促炎介质的产生<sup>[7]</sup>。这些研究表明,HO-1 可能是治疗炎症性疾病的潜在分子靶点。NQO1 能够以 NADPH 作为电子供体来使醌类物质发生还原反应,进而阻碍氧化应激反应过程中氧自由基的生成<sup>[8]</sup>。Nrf2 是 HO-1、NQO1 的上游因子,是调控 HO-1、NQO1 表达的主要蛋白,与 Keap1 共同分布于细胞质中。当 Keap1 在氧化应激下降解时,被释放的 Nrf2 迁移到细胞核中,诱导 HO-1、NQO-1 的表达<sup>[9-10]</sup>。

本研究制备 RAW264.7 细胞 LPS 炎症模型,基于 Nrf2/HO-1 信号通路研究橄榄苦苷的体外抗炎作用。

## 1 材料

### 1.1 细胞

RAW264.7 细胞,购于上海中国科学院细胞库。

### 1.2 药物及主要试剂

橄榄苦苷来自本课题组,质量分数 >98%; DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)和 PBS,购于 Gibco 公司;JC-1、LPS 试剂和 MTT 试剂盒,购于 SIGMA-ALDRICH 公司;BCA 蛋白定量试剂盒,购于美国 Thermo 公司;ELISA 试剂盒,购于欣博盛生物科技有限公司; iNOS、COX-2、NRF2、Keap-1、HO-1、NQO-1 和 GAPDH 抗体,购于美国 CST 公司; DCFH<sub>2</sub>-DA、Fluo-3AM、DAF-FM 探针购于 SIGMA-ALDRICH 公司。

### 1.3 主要仪器

恒温金属浴(BILL-10B,上海比郎仪器制造有限公司);电热鼓风干燥箱(101-1A,天津市泰斯特仪器有限公司);生物安全柜(BSC-1004IIA2,苏州安泰空气技术有限公司);CO<sub>2</sub> 培养箱(371,美国 Thermo 公司);多功能微孔板检测仪(SYNERGYH1,美国伯腾仪器有限公司);凝胶显微成像系统(1708197,美国 BIO-RAD 公司);流式细胞分析仪(LSR Fortessa,美国 BD 公司);低温高速离心机(Centrifuge 5424R,德国 Eppendorf 公司);离

心机(TD5Z, 湖南凯达科学仪器有限公司);倒置荧光显微镜(DM18, 德国徕卡公司);蛋白电泳仪和转膜仪(PowerPac HC, 美国 BIO-RAD 公司);涡旋机(QL-902, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司);医用冷藏冷冻箱(MPR-440F, 松下冷链有限公司);数显恒温水浴锅(HH-6, 常州国华电器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

RAW264.7 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。

### 2.2 橄榄苦苷对 RAW264.7 细胞活力的影响

RAW264.7 细胞以 4×10<sup>4</sup>/孔的密度种于 96 孔板过夜后,用橄榄苦苷(0、10、20、40 μmol/L)处理细胞 24 h,加入 MTT,避光培养 4 h 后弃上清,每孔加入 100 μL DMSO 并用摇床震荡溶解结晶,酶标仪 490 nm 处测量吸光度(A)值。

### 2.3 橄榄苦苷对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放的 Nitrite、IL-6 和 TNF-α 的影响

RAW 264.7 细胞以 1×10<sup>5</sup>/mL 的密度接种于 24 孔板过夜,用橄榄苦苷(10、20、40 μmol/L)预处理细胞 1 h 后,给予 LPS(1 μg/mL)刺激 24 h 造模,对照组不加 LPS 和橄榄苦苷,Griess 法测定上清液中 Nitrite 含量,ELISA 法测定上清液中 IL-6 和 TNF-α 的释放。

### 2.4 橄榄苦苷对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞的 ROS、Ca<sup>2+</sup> 的产生和线粒体膜电位(MMP)的影响

RAW264.7 细胞以 1×10<sup>5</sup>/mL 的密度接种于 24 孔板过夜,用橄榄苦苷(10、20、40 μmol/L)预处理 1 h 后,再加入 LPS(1 μg/mL)刺激 8 h 造模,对照组不加 LPS 和橄榄苦苷,相应的检测指标采用不同的探针,检测 ROS 使用 DCFH<sub>2</sub>-DA(10 μmol/L)孵育 30 min,检测 Ca<sup>2+</sup> 使用 Fluo-3AM(1 μmol/L)孵育 1 h,检测 NO 使用 DAF-FM(5 μmol/L)孵育 1 h,探针孵育后,收集并采用流式细胞仪检测;MMP 的变化使用 JC-1(10 μg/mL)孵育 30 min,用倒置荧光显微镜检测。

### 2.5 橄榄苦苷对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞 COX-2、iNOS、NRF2、Keap1、HO-1、NQO-1 蛋白表达的影响

RAW264.7 细胞以 6×10<sup>5</sup>/mL 的密度接种于 6 孔板过夜,用橄榄苦苷(10、20、40 μmol/L)预处理 1 h 后,LPS(1 μg/mL)诱导 18 h 或 8 h 造模,对照组不加 LPS 和橄榄苦苷,从培养箱中取出细胞,置于冰上弃掉培养基并用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入适量蛋白裂解液,裂解 10 min 后细胞刮将其刮下来收集于 1.5 mL EP 管,4 °C 条件下 15 000 r/min 离心 25

min,取上清,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品中加入 5×SDS-PAGE loading buffer,于金属浴中 97 °C 煮沸 7 min 使蛋白变性,10% SDS-PAGE 凝胶电泳并转 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,分别使用 iNOS、COX-2、NRF2、Keap-1、HO-1、NQO-1 和 GAPDH 的抗体(1:1 000),4 °C 孵育过夜后,TBST 洗 3 次,二抗室温下孵育 2 h,TBST 洗 3 次,化学发光法显影。

### 2.6 统计学分析

运用 GraphPad Prism 6.0 软件分析实验数据,均以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行单因素方差分析(ANOVA)评价组间差异的显著性。

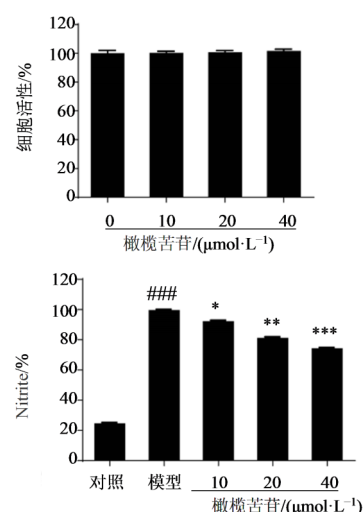
## 3 结果

### 3.1 橄榄苦苷对细胞活性及 Nitrite 释放的影响

如图 1 所示,橄榄苦苷(10、20、40 μmol/L)处理细胞 24 h 后,与 0 μmol/L 组比较,细胞活性无明显变化。与对照组比较,模型组经 LPS 处理后 RAW264.7 细胞 Nitrite 释放水平显著增加( $P < 0.001$ );与模型组比较,橄榄苦苷预处理 1 h 后,Nitrite 释放水平受到显著抑制( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结果表明,橄榄苦苷具有抗炎作用。

### 3.2 橄榄苦苷对 NO 释放及 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组 iNOS、

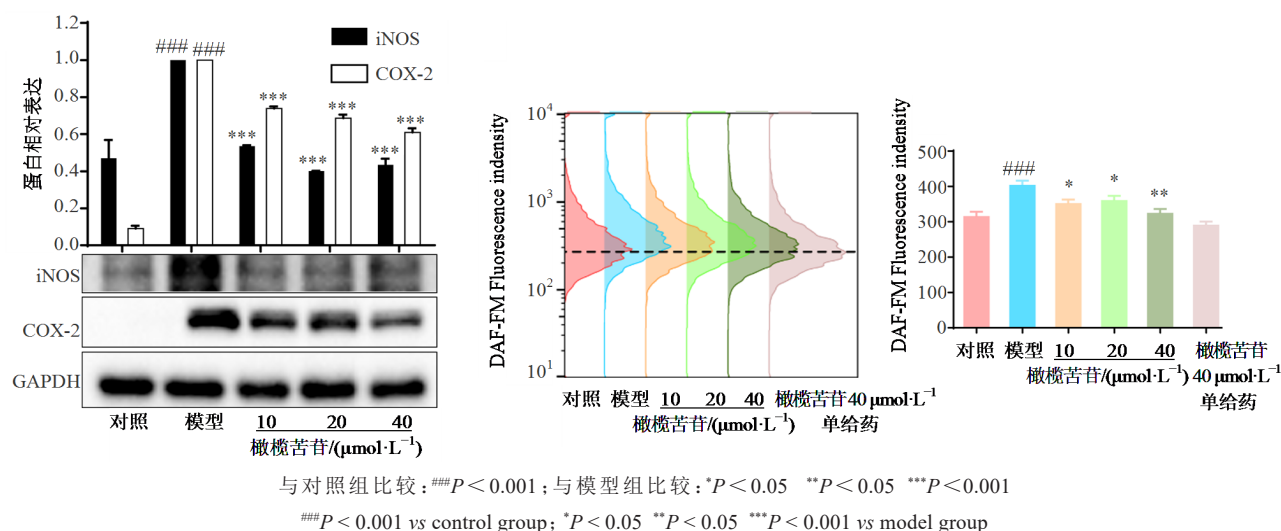


与对照组比较:  $^{###}P < 0.001$ ; 与模型组比较:  $^{*}P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$   $^{***}P < 0.001$

$^{###}P < 0.001$  vs control group;  $^{*}P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$   $^{***}P < 0.001$  vs model group

图1 橄榄苦苷对细胞活性及 Nitrite 释放的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 1 Effect of oleuropein on cell activity and nitrite release( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

图2 橄榄苦苷对NO释放及iNOS、COX-2蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )Fig.2 Effects of oleuropein on release of NO and the expression of iNOS and COX-2 proteins( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

COX-2蛋白表达水平显著增加( $P < 0.001$ );与模型组比较,橄榄苦苷组iNOS、COX-2蛋白的表达显著降低( $P < 0.001$ )。另外,采用了流式细胞术检测了细胞内NO的产生,与对照组比较,模型组NO的产生显著增加( $P < 0.001$ );与模型组比较,橄榄苦苷组NO的产生显著减少( $P < 0.05, 0.01$ )。

### 3.3 橄榄苦苷抑制LPS诱导炎症因子的释放

如图3所示,与对照组比较,模型组TNF- $\alpha$ 、IL-6释放量显著上升( $P < 0.001$ );与模型组比较,橄榄苦苷组TNF- $\alpha$ 、IL-6的释放受到显著抑制( $P < 0.001$ )。与对照组比较,模型组 $Ca^{2+}$ 水平显著上升( $P < 0.001$ );与模型组比较,橄榄苦苷组 $Ca^{2+}$ 的释放受到显著抑制( $P < 0.01$ )。结果表明,橄榄苦苷可以抑制LPS诱导的RAW264.7细胞炎症因子的分泌,发挥抗炎作用。

### 3.4 橄榄苦苷抑制LPS诱导的ROS产生和MMP的降低

如图4所示,与对照组比较,模型组ROS生成显

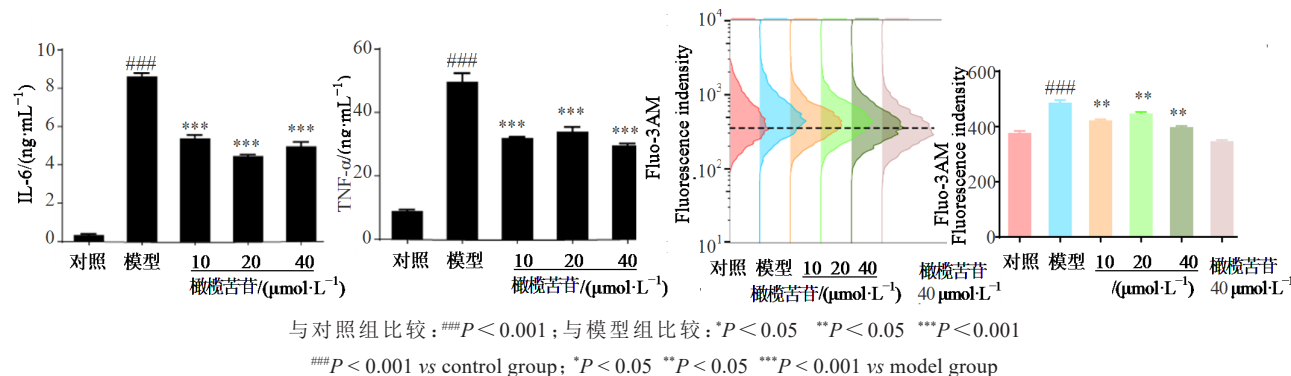
著上升( $P < 0.001$ );与模型组比较,橄榄苦苷组ROS生成受到显著抑制( $P < 0.05$ )。与对照组比较,LPS破坏了MMP的稳定性,模型组JC-1单体(绿色荧光)显著增加,而橄榄苦苷预处理后,JC-1单体降低,聚合物(红色荧光)增加。实验结果表明,橄榄苦苷可以抑制LPS诱导的RAW264.7细胞ROS的产生并维持MMP的稳定。

### 3.5 橄榄苦苷对LPS诱导的Nrf2/HO-1信号通路的影响

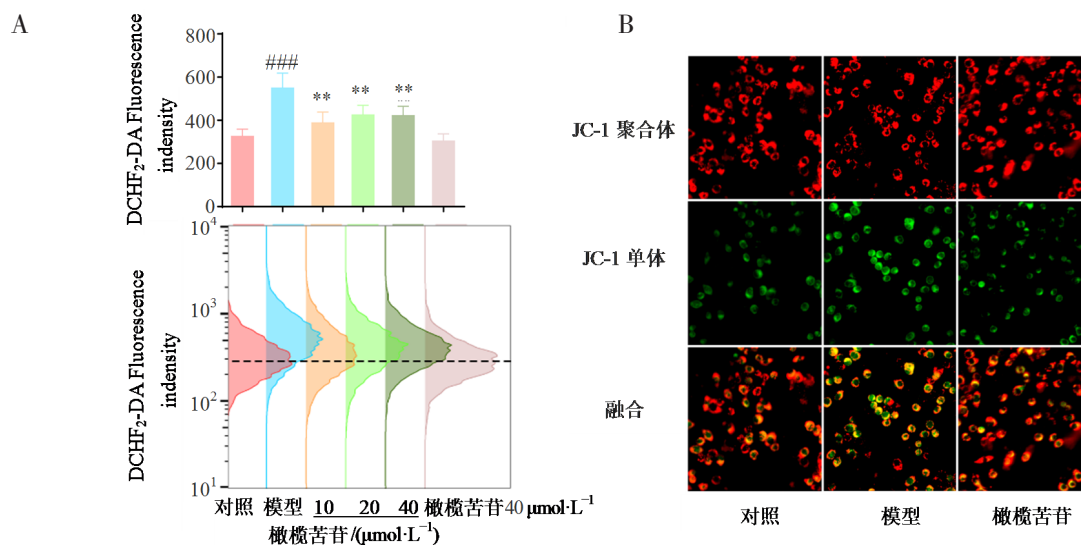
如图5所示,与对照组比较,模型组Keap1蛋白表达显著升高( $P < 0.001$ );与模型组比较,橄榄苦苷组Keap1蛋白表达显著降低,Nrf2、HO-1、NQO1蛋白的表达均显著升高( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。结果表明,橄榄苦苷可能激发Nrf2/HO-1信号通路。

## 4 讨论

炎症是生活中常见的病理反应,在人体各组织和器官中均可表现。炎症的发生与许多疾病有关,如中风、关节炎、神经退行性疾病以及心血管疾病

图3 橄榄苦苷抑制LPS诱导炎症因子的释放( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )Fig.3 Oleuropein inhibits the release of LPS-induced inflammatory cytokines( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



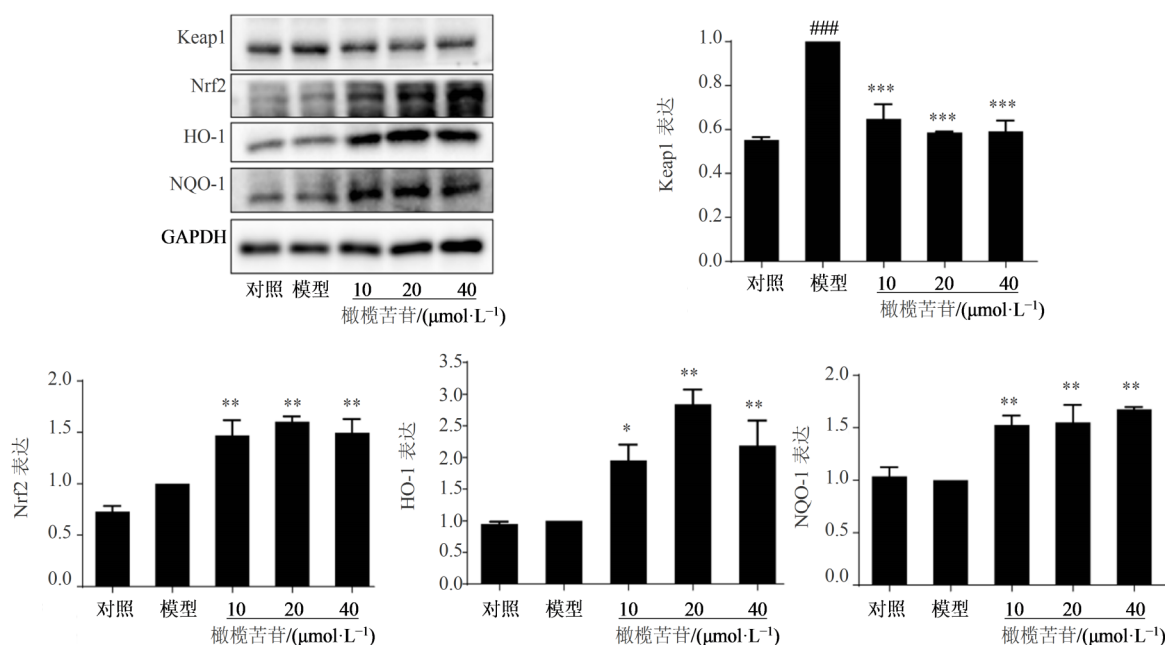


A-ROS表达水平;B-MMP;与对照组比较:### $P < 0.001$ ;与模型组比较:\*\* $P < 0.01$

A-ros expression level; B-mitochondrial membrane potential;### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  vs model group

图4 橄榄苦苷抑制LPS诱导的ROS产生和MMP的降低( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Oleuropein inhibits LPS-induced ROS production and MMP reduction( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与对照组比较:### $P < 0.001$ ;与模型组比较:\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$

### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

图5 橄榄苦苷对LPS诱导的Nrf2/HO-1信号通路的信号通路的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effects of Oleuropein on the LPS-induced Nrf2/HO-1 signaling pathway( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

等。因此,抑制炎症对治疗炎症相关疾病有着重要作用。在之前的研究中,本课题组发现从广西毛冬青中分离的得到的单体橄榄苦苷具有良好的抗炎作用<sup>[11]</sup>,本研究的主要目的在于探讨橄榄苦苷的抗炎作用及其可能的分子机制。

本实验采用LPS诱导RAW264.7的炎症模型,在LPS刺激下,巨噬细胞可以释放多种炎症因子,

而抑制这些炎症因子过度释放,可以缓解炎症反应的发生<sup>[12]</sup>。结果表明,橄榄苦苷可抑制LPS诱导的RAW264.7细胞iNOS、COX-2的表达和TNF- $\alpha$ 、IL-6、NO、Ca<sup>2+</sup>的释放。结果表明,橄榄苦苷具有抗炎活性。

在生物体内,ROS的大量积累会使机体内氧化和抗氧化体系失衡造成氧化应激,从而引起机体多

种组织和多种细胞的损伤,进而引发多种疾病,严重威胁人们的身体健康。此外,ROS的产生介导多种炎症信号通路,而MMP的变化则是一种重要的炎症反应信号<sup>[13-14]</sup>。因此我们推测抑制ROS的产生和维持MMP的稳定可作为炎症治疗的重要靶点。结果表明,橄榄苦苷显著抑制LPS诱导的RAW264.7细胞ROS的产生和MMP的降低。

HO-1是一种抗氧化酶,在应激反应下,催化降解血红素、胆绿素和一氧化碳,在炎症反应和氧化应激中起着重要作用。NQO1是一种多效酶,可将泛醌和维生素E降低为抗氧化剂形式,并可直接减少超氧化物,这表明NQO1具有主要的保护作用<sup>[15]</sup>。Nrf2是调控HO-1、NQO1表达的上游蛋白,与Keap1一起分布于细胞质。氧化应激过程发生后,Keap1降解,Nrf2被释放并迁移到细胞核,进而诱导HO-1、NQO1表达<sup>[16]</sup>。结果表明,橄榄苦苷预处理后,降低了Keap1的表达,促进了Nrf2的核易位,诱导HO-1和NQO1的表达。

橄榄苦苷具有良好的抗炎作用,其作用可能与Nrf2/HO-1通路相关,但具体的作用机制还需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Shafique K, Mirza S S, Vart P, et al. Areca nut chewing and systemic inflammation: evidence of a common pathway for systemic diseases [J]. *J Inflamm*, 2012, 9(1): 22-30.
- [2] Feuerstein G, Liu T, Barone F. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor- $\alpha$  [J]. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1994, 6(4): 341-360.
- [3] 张泉修, 刘艳丽, 李笑然, 等. 广西毛冬青的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(9): 1730-1734.
- [4] Ryu S J, Choi H S, Yoon K Y, et al. Oleuropein suppresses LPS-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cell and zebrafish [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(7): 2098-2105.
- [5] Omar S H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects [J]. *Sci Pharm*, 2010, 78(2): 133-154.
- [6] Gao H, Sun W, Zhao J, et al. Tanshinones and diethylblechnics with anti-inflammatory and anti-cancer activities from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen) [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33720.
- [7] Sahin K, Tuzcu M, Gencoglu H, et al. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats [J]. *Life Sci*, 2010, 87(7-8): 240-245.
- [8] Ghanim H, Sia C L, Korzeniewski K, et al. A resveratrol and polyphenol preparation suppresses oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate meal [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(5): 1409-1414.
- [9] Kobayashi E H, Suzuki T, Funayama R, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11624.
- [10] Kansanen E, Kuosmanen S M, Leinonen H, et al. The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer [J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 45-49.
- [11] Puel C, Quintin A, Agalias A, et al. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat [J]. *Br J Nutr*, 2004, 92(1): 119-127.
- [12] Ying X, Yu K, Chen X, et al. Piperine inhibits LPS induced expression of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells [J]. *Cell Immunol*, 2013, 285(1-2): 49-54.
- [13] Yuan R, Huang L, Du L J, et al. Dihydrotanshinone exhibits an anti-inflammatory effect *in vitro* and *in vivo* through blocking TLR4 dimerization [J]. *Pharm Res*, 2019, 142: 102-114.
- [14] Lee I T, Yang C M. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases [J]. *Biochem pharmacol*, 2012, 84(5): 581-590.
- [15] Shao M, Lu X, Cong W, et al. Multiple low-dose radiation prevents type 2 diabetes-induced renal damage through attenuation of dyslipidemia and insulin resistance and subsequent renal inflammation and oxidative stress [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92574.
- [16] Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, et al. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2013, 10(1): 7.