

山楂酸调控 STAT3 磷酸化保护 LPS 致 RAW264.7 细胞炎症反应的研究

Maslinic acid protects against LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 cells by regulating phosphorylation of STAT3

岳彩霞 陈磊 王文魁 李桂兰 胡永婷

YUE Cai-xia CHEN Lei WANG Wen-kui LI Gui-lan HU Yong-ting

(山西农业大学动物医学学院, 山西 太谷 030801)

(College of Veterinary, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

摘要:探讨山楂酸对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应的保护作用及其对信号转导和转录活化因子 3 (STAT3) 磷酸化的抑制作用。采用 Griess 法检测一氧化氮(NO)的生成, ELISA 法检测细胞中白介素 6(IL-6)、白介素 1 β (IL-1 β)和白介素 10(IL-10)的释放量; Western blot 法检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、磷酸化信号转导和转录活化因子 3(p-STAT3)、磷酸化 Janus 激酶 2(p-JAK2)和细胞因子信号抑制物 3(SOCS3)蛋白的表达, DCFH-DA 荧光探针法测定细胞中的活性氧(ROS)水平。结果表明: 山楂酸可显著抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞 NO 的生成和 ROS 的产生, 降低白介素 6 和白介素 1 β 的释放量, 提高白介素 10 的含量; 山楂酸对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞诱导型一氧化氮合酶的表达具有明显的抑制作用, 进一步的研究表明, 山楂酸呈剂量和时间依赖性地抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞信号转导和转录活化因子 3 的磷酸化并抑制其核转位, 并能抑制 Janus 激酶 2 的活化和激活细胞因子信号抑制物 3 蛋白的表达。山楂酸对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应有保护作用, 其机制与抑制信号转导和转录活化因子 3 的磷酸化相关。

关键词: 山楂酸; RAW264.7 细胞; 抗炎作用; 信号通路

Abstract: In the paper, the protective effect of maslinic acid

(MA) on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 cells was investigated, and its inhibition of transcription 3 (STAT3) phosphorylation, a signal transducer and activator, was also explored. NO generation was measured by Griess method. The levels of IL-6, IL-1 β and IL-10 were detected by ELISA. The relative expression of iNOS, p-STAT3, p-JAK2 and SOCS3 were determined by Western blot. The release of reactive oxygen (ROS) was evaluated using DCFH-DA fluorescence. Results showed that MA could significantly inhibit the NO generation and the production of ROS. MA also decreased the releases of IL-6 and IL-1 β , increased the content of IL-10. The expression of iNOS in LPS-induced RAW264.7 cells was inhibited by MA. In addition, the phosphorylation and the nuclear translocation of STAT3 could be suppressed by MA in dose and time-dependent manner. The phosphorylation of JAK2 was also inhibited by MA, while the expression of SOCS3 could be activated. These results suggested that MA protected against LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 cells, and its mechanism was probably associated with the inhibition of the phosphorylation of STAT3.

Keywords: maslinic acid; RAW264.7 cell; anti-inflammatory effect; signal pathway

山楂酸(maslinic acid, MA)属于三萜酸类物质, 存在于多种可食用的天然植物中, 如山楂、红枣、油橄榄和枇杷叶等^[1-3], 具有抗炎、抗氧化和抗 2 型糖尿病等多种生物学活性^[2,4-6]。已有研究^[2]表明, 山楂酸在体内具有抑制急性炎症的作用, 对角叉菜胶诱导的大鼠足肿胀有保护作用。体外研究^[3,7]也发现, MA 的抗炎机制与抑制白介素 6(Interleukin-6, IL-6)、白介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor α , TNF- α)

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301452);山西农业大学引进人才科研启动基金(编号:XB2012013);山西农业大学科技创新基金(编号:201313)

作者简介:岳彩霞,女,山西农业大学在读硕士研究生。

共同第一作者:陈磊,男,山西农业大学在读硕士研究生。

通信作者:李桂兰(1980—),女,山西农业大学副教授,博士。

E-mail: lg18000@163.com

收稿日期:2021-04-21

等细胞因子的分泌有关。诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)是 NO 合成的调控因子,受细胞因子的诱导表达和调节^[8-9]。Janus 激酶/信号转导与转录激活子(Janus kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)是重要的炎症信号转导途径之一,能够介导免疫应答^[10]。信号转导和转录活化因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导炎症反应的关键性调控因子^[11]。

目前,MA 调控炎症的研究主要集中于体外动物模型中抗炎效果的观察及细胞模型中抑制炎症因子的表达^[2-3,12]。王乐旬等^[7]研究发现 MA 可抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应机制可能与调控 NF- κ B、STAT3 和 AKT 的活性相关,然而,MA 在 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中是否通过调控 STAT3 的磷酸化发挥抗炎作用的具体分子机制尚不明确,研究拟利用课题组^[13]前期建立的 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型,在体外细胞水平观察 MA 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应的影响,进一步探讨 MA 能否通过调控 STAT3 的磷酸化来减轻 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的炎性反应,为揭示 MA 的抗炎机制、综合开发利用 MA 作为天然抗炎药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

RAW264.7 细胞:中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

1.1.2 药品与试剂

MA(CAS: 4373-41-5): 纯度 $\geq 98\%$, 美国 Sigma 公司;

脂多糖(LPS)和 DCFH-DA: 美国 Sigma 公司;

DMEM 培养基: 美国 gibco 公司;

标准胎牛血清: 杭州四季青生物技术有限公司;

核蛋白提取试剂盒: 北京索莱宝科技有限公司;

NO 测试试剂盒: 碧云天生物技术研究;

IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 ELISA 试剂盒: 上海江莱生物技术有限公司;

β -actin 抗体: 北京中杉金桥生物公司;

STAT3 和 iNOS 抗体: 武汉三鹰技术有限公司;

p-STAT3(Y705)、p-STAT3(S727)、JAK2、p-JAK2 和 SOCS3 抗体: 北京博奥森生物技术有限公司;

辣根过氧化物标记山羊抗鼠和山羊抗兔 IgG: 北京康为世纪生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RAW264.7 细胞使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、5.0% CO₂ 的细胞培养箱中。

1.2.2 给药及分组 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 参照课题组^[13]前期建立的 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型进行分组, 分为对照组(以含 10% 胎牛血清的完全培养基培养)、LPS 模型组(以含 1 μ g/mL LPS 的完全培养基培养 24 h)和山楂酸组(不同浓度的山楂酸预处理 2 h 后, 再用含 1 μ g/mL LPS 和相应浓度山楂酸的完全培养基继续培养 24 h), 每组至少设 3 个重复。

1.2.3 NO 含量的测定 取对数生长期的细胞接种至 96 孔板, 以不同浓度的 LPS 单独刺激 RAW264.7 细胞 24 h, 并以不同浓度的山楂酸预作用细胞 2 h 后, 再用含 1 μ g/mL LPS 继续培养进行试验, 每组设 6 个重复孔。培养结束后, 按照试剂盒说明书进行 NO 含量的测定。

1.2.4 ELISA 检测相关的细胞因子 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 药物作用培养结束后, 吸取每组细胞的上清液, 加入 96 孔板, 按照 ELISA 试剂盒的操作说明, 分别测定细胞因子 IL-6、IL-1 β 和 IL-10 的含量, 并进行统计分析。

1.2.5 蛋白提取及 Western blot 试验 按照试验分组培养结束后, 用现配的 RIPA 细胞裂解液裂解细胞 30 min, 提取各组 RAW264.7 细胞总蛋白, 并按照核蛋白提取试剂盒说明书提取相应的核蛋白。取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 5% 的脱脂牛奶封闭, 一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗(HRP 标记)室温孵育 1 h 后, 暗室内 ECL 显色法曝光, 进行蛋白条带定量分析。

1.2.6 ROS 的测定 取对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 12 孔板, 按试验分组进行细胞爬片, 作用结束后, 吸出培养基, 用 PBS 清洗, 每组加入含 10 μ mol/L DCFH-DA 的无血清培养基, 37 °C 避光孵育细胞 30 min, 弃掉培养基, PBS 清洗。取出细胞爬片, 在荧光显微镜(200 $\times$)下观察荧光强度并拍照。

1.3 数据分析

采用 Graphpad Prism 5 软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差, 所有数值使用 mean $\pm$ SD 表示, 并设置多个重复, $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 MA 对 RAW264.7 细胞 NO 生成量的影响

由图 1(a)可知, 与正常对照组相比, NO 生成量随 LPS 刺激浓度的升高显著增加($P < 0.01$); 由图 1(b)可知, 与 LPS 模型组相比, 5, 10, 15, 20, 25 μ mol/L MA 干预后 NO 含量依次显著降低($P < 0.01$), 且呈一定的剂量

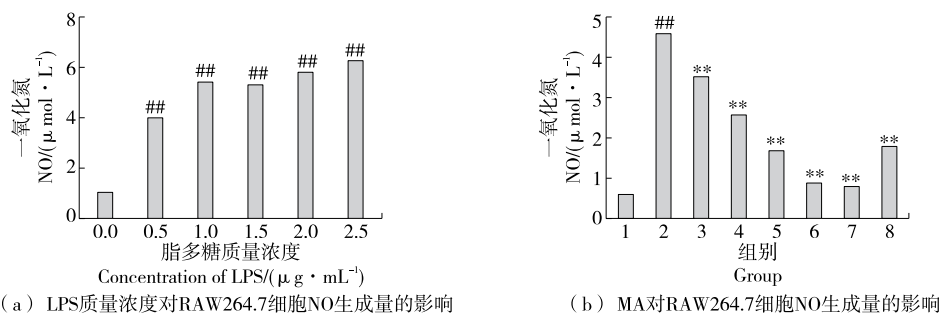
依赖性,而 30 $\mu\text{mol/L}$ MA 作用后 NO 含量有所增加,可能与 MA 的剂量较大有关。综上,MA 可以明显抑制由 LPS 引起的 RAW264.7 细胞的 NO 生成量增加。

2.2 MA 对 RAW264.7 细胞因子释放和 iNOS 蛋白表达的影响

由图 2(a)~图 2(c)可知,LPS 刺激 RAW264.7 细胞后 IL-6、IL-1 β 和 IL-10 释放显著增加,与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),MA 可不同程度地拮抗 RAW264.7 细胞中 IL-6 和 IL-1 β 的释放,而与 LPS 模型组相比,MA 作用可显著增加 RAW264.7 细胞中 IL-10 的含量 ($P < 0.01$),且呈一定的剂量依赖性。研究表明,受 LPS 刺激的巨噬细胞会产生大量的炎症因子如 IL-1 β 、

IL-6 和 TNF- α 等,导致炎症细胞浸润,与炎症的发生发展密切相关^[14],而 IL-10 是巨噬细胞产生的一种重要的抗炎细胞因子,其表达对于炎症在进行免疫干预治疗方面十分关键^[15]。研究结果显示,MA 能明显抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 IL-1 β 、IL-6 的释放,增加 IL-10 的含量,从而可以较好地抑制 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应。

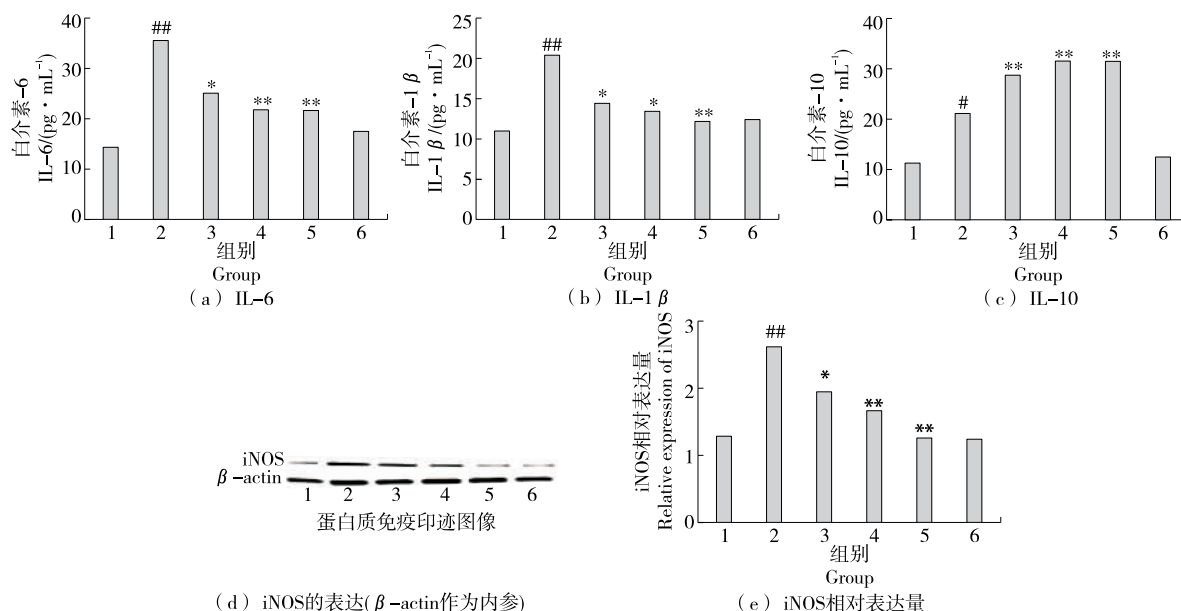
iNOS 是重要的炎症因子,在 LPS 的刺激下 iNOS 表达增加进而诱导 NO 的大量产生^[16]。采用 Western blot 法检测了 LPS 诱导后 RAW264.7 细胞中 iNOS 的表达,如图 2(d)和图 2(e)所示,10,15,20 $\mu\text{mol/L}$ MA 可剂量依赖性地抑制 LPS 诱导的 iNOS 蛋白的表达 ($P < 0.05$),而 20 $\mu\text{mol/L}$ MA 单独刺激细胞,iNOS 蛋白的表达与对



1. 空白组 2. LPS 组 3. 5 $\mu\text{mol/L}$ MA+LPS 4. 10 $\mu\text{mol/L}$ MA+LPS 5. 15 $\mu\text{mol/L}$ MA+LPS 6. 20 $\mu\text{mol/L}$ MA+LPS 7. 25 $\mu\text{mol/L}$ MA+LPS 8. 30 $\mu\text{mol/L}$ MA+LPS #. 与对照组相比 $P < 0.01$ * *. 与 LPS 组相比 $P < 0.01$

图 1 MA 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 生成量的影响

Figure 1 Effect of MA on NO generation in LPS-induced RAW264.7 cells ($n = 6$)



1. 空白组 2. LPS 组 3. 10 $\mu\text{mol/L}$ MA+LPS 4. 15 $\mu\text{mol/L}$ MA+LPS 5. 20 $\mu\text{mol/L}$ MA+LPS 6. 20 $\mu\text{mol/L}$ MA #. 与对照组相比 $P < 0.01$ #. 与对照组相比 $P < 0.05$ * *. 与 LPS 组相比 $P < 0.01$ *. 与 LPS 组相比 $P < 0.05$

图 2 山柰酸对 LPS 诱导的细胞因子释放和 iNOS 蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of MA on the releases of cytokines and the expression of iNOS in LPS-induced RAW264.7 cells ($n \geq 3$)

照组无显著差异($P>0.05$)。NO 是 iNOS 的产物,炎症疾病发生时 iNOS 通常表达增加,因此抑制 iNOS 的表达对减轻炎症反应很重要^[8-9,16]。在试验中,可以得出 MA 能通过抑制 LPS 诱导的 iNOS 表达,进而抑制 NO 的释放。

2.3 MA 浓度对 RAW264.7 细胞 STAT3 的影响

STAT3 在调控 iNOS 过程中发挥了重要的作用^[17],利用 Western blot 检测 MA 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 STAT3 的 Y705 和 S727 位点磷酸化产生影响,结果如图 3(a)所示,LPS 刺激能快速诱导胞内 STAT3 的酪氨酸和丝氨酸磷酸化,而经不同浓度(5,10,15,20 $\mu\text{mol/L}$)的 MA 处理细胞后,胞内 p-STAT3 (Y705) 和 p-STAT3 (S727) 蛋白的表达明显被抑制($P<0.01$),且呈剂量依赖性。已有研究^[18]表明,STAT3 的磷酸化有助于 STAT3 的二聚化并促进其核转位并发挥转录活性,由此猜测 MA 是否也抑制 STAT3 的入核,通过提取细胞核蛋白进行检测,结果如图 3(b)所示,LPS 刺激后 STAT3 快速入核,细胞经 MA 处理后核内 p-STAT3 (Y705) 和 p-STAT3 (S727) 蛋白表达显著下降($P<0.05$),并且呈剂量依赖性。由此得出,MA 能下调 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 p-STAT3 的表达并抑制 STAT3 的核转位,p-STAT3 的表达量与 MA 浓度具有明显的量效关系。

2.4 MA 刺激时间对 RAW264.7 细胞 STAT3 的影响

选用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 MA 预孵细胞 2 h,1 $\mu\text{g/mL}$ LPS

分别作用细胞 0,1,2,4,8 h 后,检测细胞和核内 p-STAT3 的蛋白表达变化。如图 4 所示,LPS 刺激 4~8 h 时,MA 能显著降低胞内 STAT3 的酪氨酸和丝氨酸磷酸化水平($P<0.05$),且呈一定的时间依赖性,在 LPS 刺激 8 h 时,MA 能显著降低核内 p-STAT3 (Y705) 和 p-STAT3 (S727) 的表达($P<0.01$),由此表明,LPS 诱导的 RAW264.7 胞内 p-STAT3 的表达与 MA 浓度之间具有一定的时间依赖性。

研究^[19]表明,STAT3 在增殖、生长、凋亡、免疫等重要的生理过程中发挥调控作用,而 STAT3 的异常活化可导致炎症反应与多种疾病相关。已有研究^[20-21]证实,STAT3 作为典型的炎症信号通路可以调节 iNOS 及相关促炎因子包括 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等的表达。由此可以推测,MA 可以通过对 STAT3 磷酸化的影响抑制其合成 iNOS 及对炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 的释放。

2.5 MA 对 RAW264.7 细胞 p-JAK2 和 SOCS3 表达的影响

如图 5 所示,与对照组相比,LPS 模型组 JAK2 的磷酸化水平显著升高($P<0.05$),SOCS3 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与 LPS 模型组相比,不同浓度的 MA 可抑制 p-JAK2 的蛋白表达($P<0.05$),而激活 SOCS3 蛋白表达($P<0.05$),并均呈一定的剂量依赖性。结果表明,MA 能抑制 JAK2 的磷酸化水平,激活 SOCS3 的蛋白表达,与其抗炎机制相关。

STAT3 的激活依赖于 JAK 的活化,且有研究^[22]表

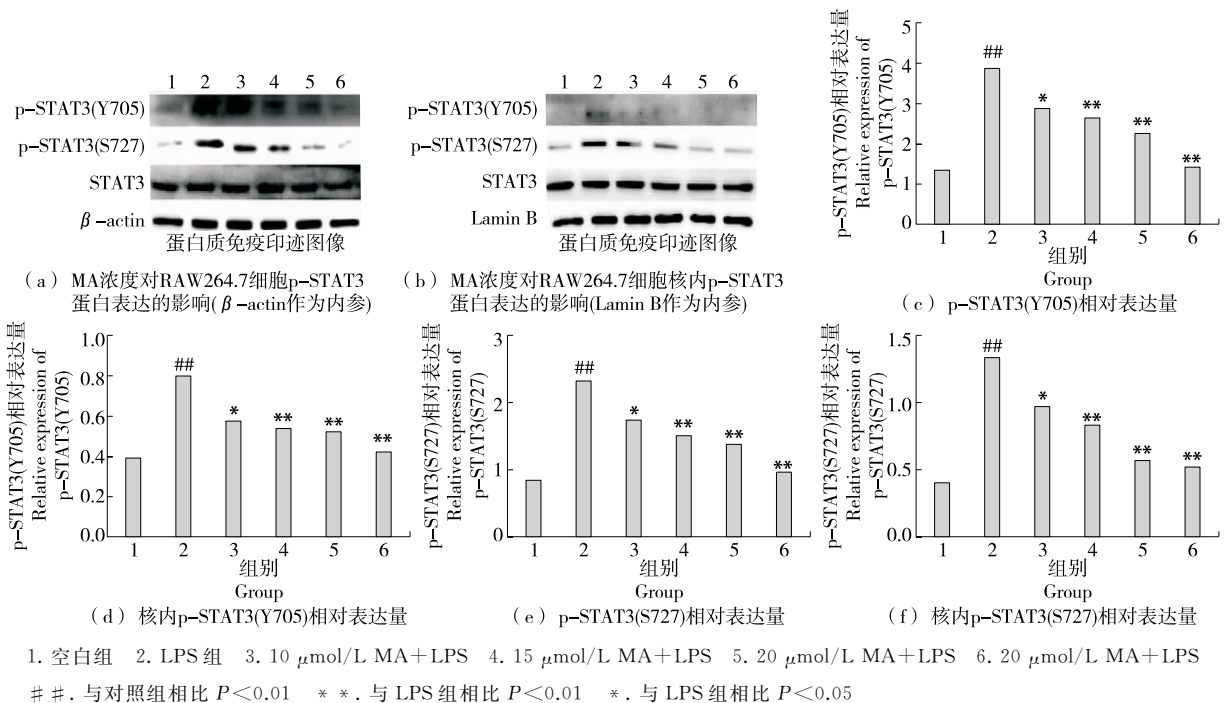


图 3 MA 浓度对 RAW264.7 细胞 STAT3 的影响

Figure 3 Effects of MA on LPS-induced STAT3 in RAW264.7 cells in different doses ($n=3$)

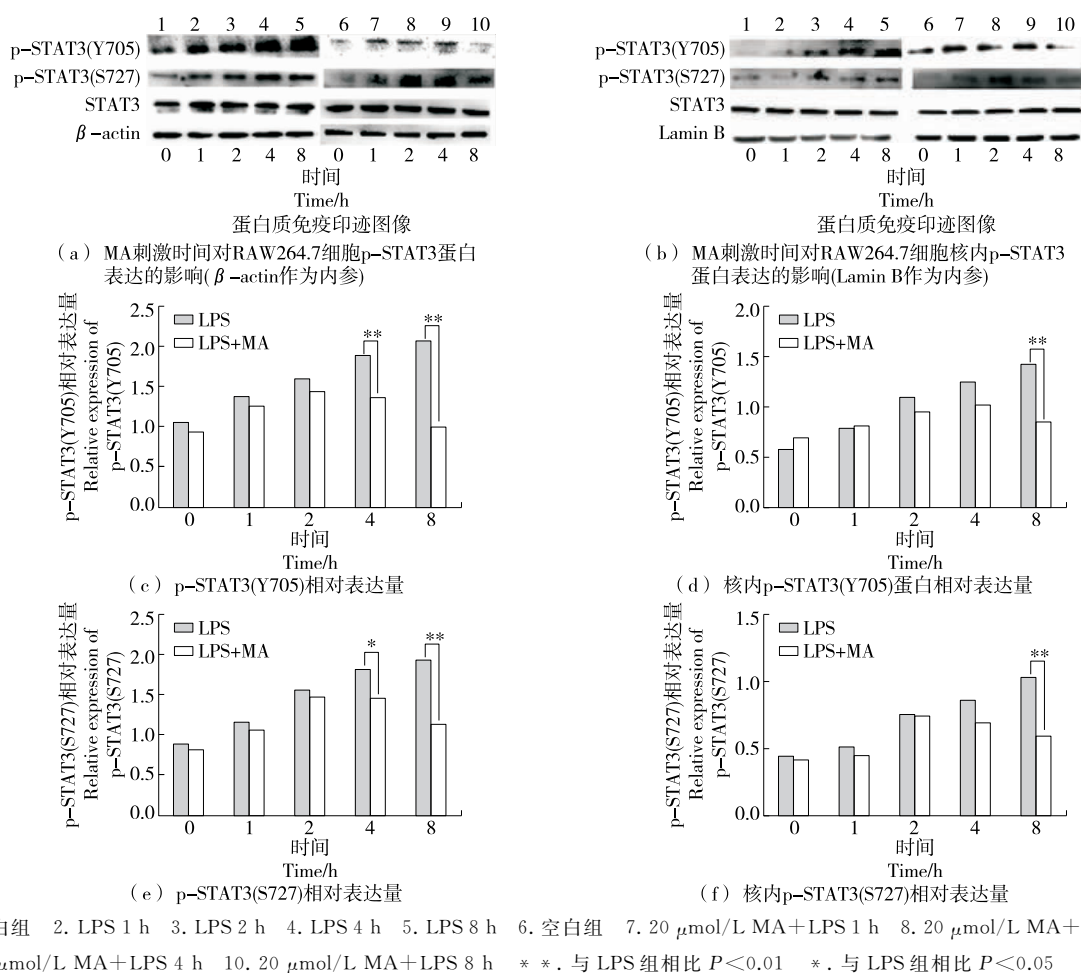


图4 MA刺激时间对RAW264.7细胞STAT3的影响

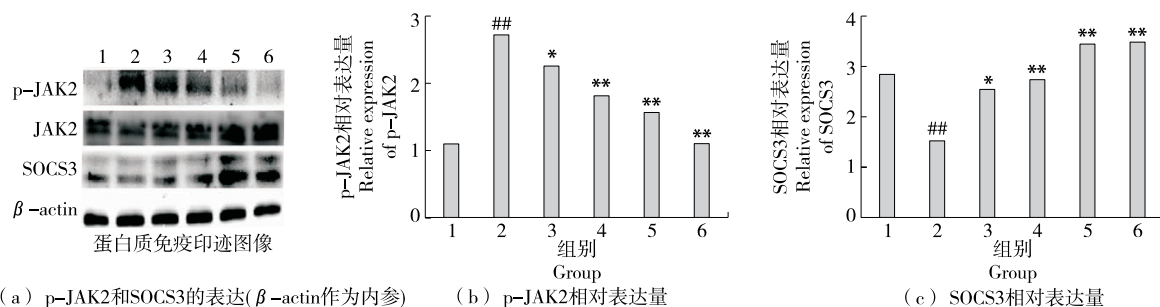
Figure 4 Effects of MA on LPS-induced STAT3 in RAW264.7 cells in different times($n=3$)

图5 MA对LPS诱导的RAW264.7细胞中p-JAK2和SOCS3表达的影响

Figure 5 Effects of MA on expression of p-JAK2 and SOCS3 in LPS-induced RAW264.7 cells ($n=3$)

明,SOCS蛋白可以抑制JAK的活性。故检测了MA对RAW264.7细胞中p-JAK2和SOCS3表达的影响,进一步确定MA对JAK/STAT通路的作用,试验结果表明,MA可以通过调控JAK2/STAT3通路抑制LPS诱导的RAW264.7细胞炎症反应。

2.6 MA对RAW264.7细胞ROS水平的影响

细胞内ROS的产生对于炎症信号传导发挥着重要的作用。采用DCFH-DA检测山植酸对RAW264.7细胞中ROS水平的变化。荧光显微镜(200 $\times$)下观察如图6所示,与对照组相比,LPS刺激后荧光强度显著增强($P <$

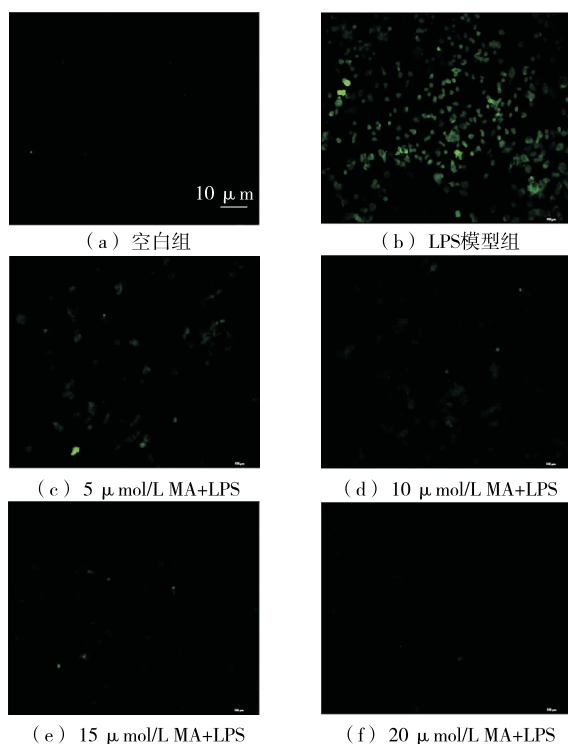


图6 MA对LPS诱导RAW264.7细胞ROS水平的影响
Figure 6 Effects of MA on the ROS level in LPS-induced RAW264.7 cells (200×, DCFH-DA)

0.01),不同剂量的山楂酸干预后,荧光强度依次减弱,表明ROS水平显著被抑制($P < 0.01$),提示山楂酸可能通过降低RAW264.7细胞胞内ROS的释放发挥抗炎作用。

在巨噬细胞中,ROS可以作为第二信使参与细胞的增殖、分化和成熟,但在致病因子作用下,ROS在机体中迅速大量表达,通过激活胞内多条信号通路包括JAK-STAT来诱导促炎因子的释放和大量炎症介质的产生^[23]。故测定了MA对RAW264.7细胞中ROS水平的影响,试验结果显示,MA能抑制LPS诱导的RAW264.7细胞ROS的释放,与李桂兰等^[5]发现的MA具有一定的抗氧化功能相一致。

由此,根据研究结果和之前的相关研究,提出山楂酸发挥抗炎保护作用可能的分子机制如图7所示。

3 结论

在脂多糖诱导的RAW264.7细胞炎症反应模型中,山楂酸能通过抑制一氧化氮的生成、抑制白介素6和白介素 1β 释放,增加白介素10的含量发挥抗炎保护作用,研究结果表明山楂酸可能通过抑制Janus激酶2/信号转导与转录激活子3信号通路发挥抗炎作用,其机制还与抑制胞内活性氧的释放相关。但山楂酸如何通过活性氧调控Janus激酶/信号转导与转录激活子信号通路,山楂酸是否还可以通过其他一些方式来抑制Janus激酶/信号

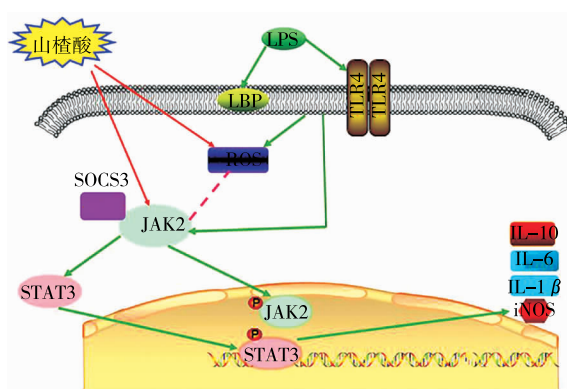


图7 山楂酸发挥抗炎保护作用的分子机制

Figure 7 Protective mechanism of anti-inflammatory of MA

转导与转录激活子信号通路,相关的机制研究还有待进一步的深入。

参考文献

- [1] LI C H, YANG Z F, LI Z X, et al. Maslinic acid suppresses osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss by regulating RANKL-mediated NF- κ B and MAPK Signaling pathways[J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2011, 26(3): 644-656.
- [2] ALVAREZ M E, ROTELLI A E, PELZER L E, et al. Phytochemical study and anti-inflammatory properties of *Lampaya hieronymi* Schum. ex Moldenke[J]. Farmaco, 2000, 55(6/7): 502-505.
- [3] MÁRQUEZ MARTÍN A, DE LA PUERTA VÁZQUEZ R, FERNÁNDEZ-ARCHE A, et al. Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages[J]. Free Radical Research, 2006, 40(3): 295-302.
- [4] MKHWANAZI B N, SERUMULA M R, MYBURG R B, et al. Antioxidant effects of maslinic acid in livers, hearts and kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats: Effects on kidney function[J]. Renal Failure, 2014, 36(3): 419-431.
- [5] 李桂兰, 郑开丰, 秦韶刚, 等. 山楂酸对H₂O₂诱导的BRL-3A细胞氧化损伤及p38和Nrf2/HO-1通路的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(3): 453-460.
- [6] LIU J, SUN H B, DUAN W G, et al. Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(11): 2 075-2 078.
- [7] 王乐旬, 吴惠娟, 张盛昔, 等. 山楂酸对LPS诱导RAW264.7细胞炎症反应的作用及机制[J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(2): 219-224.
- [8] MACMICKING J, XIE Q W, NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function[J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15: 323-350.
- [9] CHESROWN S E, MONNIER J, VISNER G, et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, INF- γ ,

- TGF- β , and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 200(1): 126-134.
- [10] SHUAI K, LIU B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(11): 900-911.
- [11] HU Y S, HAN X, LIU X H. STAT3: A potential drug target for tumor and inflammation[J]. *Curr Top Med Chem*, 2019, 19(15): 1 305-1 317.
- [12] WANG Y Y, DIAO B Z, ZHONG L H, et al. Maslinic acid protects against lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury in mice[J]. *Microb Pathog*, 2018, 119: 49-53.
- [13] 陈磊. 山楂酸对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的抗炎作用及其机制研究[D]. 太谷: 山西农业大学, 2019: 12-17.
- [14] ANNE F McGettrick, LUKE A J O'Neill. How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(32): 22 893-22 898.
- [15] GABRYSOVA L, HOWES A, SARAIVA M, et al. The regulation of IL-10 expression[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014, 380: 157-190.
- [16] MARTÍN M C, MARTINEZ A, MENDOZA J L, et al. Influence of the inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) on inflammatory bowel disease susceptibility[J]. *Immuno Genetics*, 2007, 59(11): 833-837.
- [17] BI X X, WANG P, MA Q J, et al. Anti-inflammatory activities and liver protection of alisol F and 25-anhydroalisol F through the inhibition of MAPK, STAT3, and NF- κ B activation in vitro and in vivo[J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 951.
- [18] AGGARWAL B B, KUNNUMAKKARA A B, HARIKUMAR K B, et al. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: How intimate is the relationship? [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1 171: 59-76.
- [19] SONG L X, TURKSON J, KARRAS J G, et al. Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22(27): 4 150-4 165.
- [20] MA Y F, TANG T, SHENG L L, et al. Aloin suppresses lipopolysaccharide induced inflammation by inhibiting JAK1 STAT1/3 activation and ROS production in RAW264.7 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4): 1 925-1 934.
- [21] KOU X J, QI S M, DAI W X, et al. Arctigenin inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS expression in RAW264.7 cells through suppressing JAK-STAT signal pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(8): 1 095-1 102.
- [22] LINOSSI E M, CALLEJA D J, NICHOLSON S E. Understanding SOCS protein specificity [J]. *Growth Factors*, 2018, 36 (3/4): 104-117.
- [23] D'AUTRÉAUX B, TOLEDANO M B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8 (10): 813-824.
- (上接第 23 页)
- [20] ZHANG Bin-jia, GILBERT E P, QIAO Dong-ling, et al. A further study on supramolecular structure changes of waxy maize starch subjected to alkaline treatment by extended-q small-angle neutron scattering[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 95: 133-142.
- [21] LI Nan-nan, WANG Li-li, ZHAO Si-ming, et al. An insight into starch slowly digestible features enhanced by microwave treatment[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 103: 105690.
- [22] NAREE D, PRISANA S, JENSHINN L, et al. Retrogradation and digestibility of rice starch gels: The joint effect of degree of gelatinization and storage[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(6): 1 400-1 410.
- [23] 王晓培, 陈正行, 李娟, 等. 湿热处理对大米淀粉理化性质及其米线品质的影响[J]. *食品与机械*, 2017, 33(5): 182-187, 210.
- [24] WAIGH T A, GIDLEY M J, KOMANSHEK B U, et al. The phase transformations in starch during gelatinisation: A liquid crystalline approach[J]. *Carbohydrate Research*, 2000, 328(2): 165-176.
- [25] AMBIGAIPALAN P, HOOVER R, DONNER E, et al. Retrogradation characteristics of pulse starches [J]. *Food Research International*, 2013, 54(1): 203-212.
- [26] WANG Shu-jun, LI Cai-li, COPELAND L, et al. Starch retrogradation: A comprehensive review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2015, 14(5): 568-585.
- [27] SEVENOU O, HILL S E, FARHAT I, et al. Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2003, 31(1/2/3): 79-85.
- [28] 邹金浩, 李燕, 欧阳华峰, 等. 不同薯类淀粉结构性质与粉条品质的关系研究[J]. *食品科学*, 2020, 41(23): 77-82.
- [29] 欧阳梦云, 王燕, 赵传文. RS₃型糯米抗性淀粉制备方法对其结构和理化性质的影响[J]. *食品与机械*, 2017, 33(8): 14-18.
- [30] QIAO Dong-ling, XIE Feng-wei, ZHANG Bin-jia, et al. A further understanding of the multi-scale supramolecular structure and digestion rate of waxy starch[J]. *Food Hydrocolloid*, 2017, 65: 24-34.
- [31] KIM H R, CHOI S J, PARK C S, et al. Kinetic studies of in vitro digestion of amylase-modified waxy corn starches based on branch chain length distributions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 65: 46-56.
- [32] 马丽苹, 焦昆鹏, 罗磊, 等. 怀山药抗性淀粉理化性质及体外消化性研究[J]. *食品与机械*, 2017, 33(11): 41-46.
- [33] 詹锦玲, 孙冰华, 谢雅芸, 等. 马铃薯淀粉颗粒的粒度与酶解特性相关性研究[J]. *食品与机械*, 2017, 33(10): 39-42.
- [34] TOUTOUNJI M R, FARAHNAKY A, SANTHAKUMAR A B, et al. Intrinsic and extrinsic factors affecting rice starch digestibility[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 88: 10-22.
- [35] COLONNA P, LELOUP V, BULÉON A. Limiting factors of starch hydrolysis[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 46 (Suppl 2): S17-S32.