

STAT3 抗肿瘤抑制剂的研究进展

邹 杨¹, 刘 园¹, 黄 薇^{1,2}, 崔景荣¹, 金宏威¹, 张亮仁¹, 刘振明^{1*}

(1. 北京大学药学院, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191;
2. 中国医学科学院基础医学研究所&北京协和医学院基础学院药理学系, 北京 100005)

摘要: 信号转导与转录激活因子 3 (Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是一种在细胞中参与大量细胞因子及生长因子应答的信号转导蛋白, 负责调控细胞的生长、增殖、分化以及凋亡等一系列重要的生理过程。研究发现, STAT3 的持续性活化与肿瘤的发生发展密切相关。抑制 STAT3 信号通路的异常活化已成为抗肿瘤药物研发的热门靶点之一。本文从作用于 STAT3 蛋白的 N 末端结构域、DNA 结合域、SH2 结构域以及 C 末端转录活化结构域的角度, 总结了近年来 STAT3 抗肿瘤抑制剂的研究进展。

关键词: 信号转导与转录激活因子 3; 抗肿瘤; 抑制剂; DNA 结合域; N 末端结构域

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2018) 10-1598-11

Advances on anti-neoplastic STAT3 inhibitors

ZOU Yang¹, LIU Yuan¹, HUANG Wei^{1,2}, CUI Jing-rong¹, JIN Hong-wei¹,
ZHANG Liang-ren¹, LIU Zhen-ming^{1*}

(1. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; 2. Department of Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract: Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is a kind of signal transduction protein involved in cell proliferation, differentiation, apoptosis and other important physiological processes in response to a large number of cytokines and growth factors in cells. It has been shown that constitutive activation of STAT3 is closely associated with oncogenesis and tumorigenesis. Inhibition of aberrant STAT3 signaling has been one of promising strategies for the development of anti-neoplastic therapeutics. The review summarizes the latest progress of STAT3 inhibitors in recent years from the perspective of targeting N-terminal domain, DNA binding domain, SH2 domain and C-terminal transactivation domain of STAT3.

Key words: signal transducer and activator of transcription 3; anti-tumor; inhibitor; DNA binding domain; N-terminal domain

STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是信号转导与转录激活因子 STAT

蛋白家族的重要成员。STAT 家族具有信号转导和转录活化双重功能, 当细胞因子或生长因子激活相应受体后, STAT 蛋白被激活后, 将胞外信号转入细胞核内, 从而调控相关基因的转录与表达。迄今为止, 在哺乳动物细胞中已有 7 个 STAT 家族成员被报道, 分别为 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B 和 STAT6, 其中, STAT3 广泛存在于各类细胞和组织中^[1], 能够被多种细胞因子激活。在正常生

收稿日期: 2018-06-14; 修回日期: 2018-07-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503091, 21572010, 21772005);
协和青年科研基金与中央高校基本科研业务费专项基金资助项目 (2017350002).

*通讯作者 Tel: 13311134423, E-mail: zmlu@bjmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0559

理状态下, STAT3 的活化快速而短暂,但在多种肿瘤细胞中, STAT3 则被持续性激活并呈高水平表达^[2, 3],研究已证实 STAT3 与肿瘤的形成与发展密切相关。

1 STAT3 与肿瘤

1.1 STAT3 的结构

1994 年, STAT3 作为白细胞介素-6 (IL-6) 炎症反应过程中的急性期反应因子 (acute-phase response factor, APRF) 被纯化出来。研究表明, STAT3 的表达在心脏、肝脏、大脑、胸腺及睾丸中水平较高^[4]。STAT3 蛋白由 750~795 个氨基酸组成,相对分子质量约为 92 kDa,其在细胞中存在 4 种异构体,包括长型的 STAT3 α 、截短型的 STAT3 β 和 STAT3 γ 、以及 STAT3 δ ^[5, 6]。该蛋白主要包含 6 个结构域 (图 1): N 末端结构域、卷曲-螺旋结构域、DNA 结合域、连接结构域、SH2 结构域 (Src homology 2 domain)、C 末端转录活化结构域。此外, STAT3 还有 2 个重要的磷酸化位点: 酪氨酸磷酸化位点 (Y705) 和丝氨酸磷酸化位点 (S727)。其中, N 末端结构域、DNA 结合域、SH2 结构域的作用最为重要,靶向这三个结构域中的任意一个均能达到直接抑制 STAT3 的效果^[7-10]。

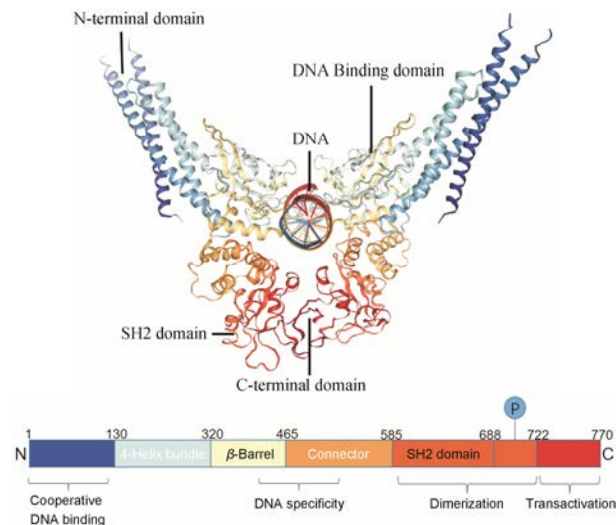


Figure 1 The ribbon diagram of the STAT3 homodimer-DNA complex (PDB ID: 4E68) and domain structure of STAT3 with the individual domains indicated [dark blue =N-terminal (1-130), light blue=4-helix bundle (131-320), light yellow =DNA binding (321-465), light orange = connector (465-585), orange = SH2 (586-722), red =C-terminal (723-770)]

1.2 STAT3 的信号转导通路

STAT3 蛋白能够被受体和非受体酪氨酸激酶磷酸化而激活^[11-14] (图 2)。在经典的 JAK-STAT3 信号通路中,细胞因子、生长因子等多肽类配体与细胞膜上相应的受体结合,导致后者形成二聚体,进而招募

并激活细胞质中的 JAK 激酶 (Janus kinase, JAKs) 蛋白^[15]。研究表明这些因子包括: ① 细胞因子 (如 IL-6、干扰素- α 等)^[16]; ② 生长因子 [如血小板源性生长因子、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 等]; ③ G 蛋白 (如促甲状腺素类、巨噬细胞炎症蛋白质等)^[17]。活化后的 JAK 将膜上受体磷酸化, STAT3 蛋白通过 SH2 结构域与该受体磷酸化的酪氨酸残基结合,并在 JAK 的作用下磷酸化 Y705 残基,从而实现活化并形成二聚体^[18, 19]。二聚化的 STAT3 与受体分离后,进入细胞核,结合到靶基因的 DNA 应答元件上,调节靶基因的转录和表达。此外,非受体酪氨酸激酶如 v-Abl、c/v-Src^[20, 21]也可以激活 STAT3 蛋白,实现 STAT3 的磷酸化和二聚化,使其转入细胞核内发挥信号转导与转录调控的作用。

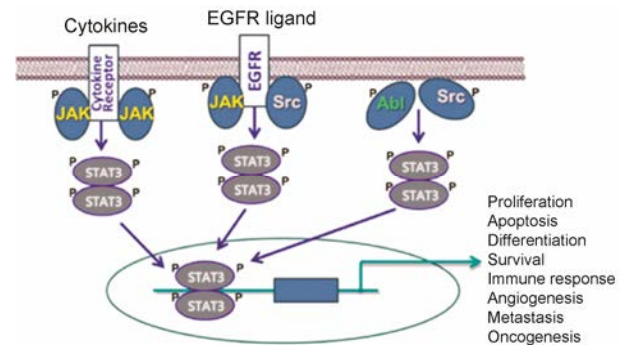


Figure 2 STAT3 signaling and its activation signals. Cytokines or growth factors binding to their corresponding cell surface receptors activates the Tyr kinases activities of the receptors, JAKs or Src. STAT3 is recruited to the activated receptor for phosphorylation by Tyr kinases on critical Tyr residue, leading to STAT3:STAT3 dimerization and activation. Nonreceptor Tyr kinases Src and Abl also activate STAT3. Activated STAT3 translocates from the cytoplasm to the nucleus where it binds DNA and coactivators and induces gene transcription

1.3 STAT3 与肿瘤形成

在正常细胞中, STAT3 的激活迅速而短暂。核蛋白酪氨酸磷酸酶如 TC-PTP 和 TC45 等能够使已经磷酸化的 STAT3 去磷酸化,从而使细胞核内的 STAT3 蛋白返回到细胞质中^[22, 23]。然而,在肿瘤组织中,癌细胞和周围的一些炎症细胞可产生并释放各种可溶性因子到肿瘤微环境中,使 STAT3 持续活化,从而促进肿瘤的发生和发展。

STAT3 作为一种在肿瘤细胞的生长、增殖、血管生成和侵袭中重要的参与者,其表达失调与多种肿瘤的发展相关。研究发现,在多种人类实体肿瘤以及血液瘤细胞中均呈现出 STAT3 的异常高表达和持续性激活,如卵巢癌^[24]、胰腺癌^[25]、前列腺癌^[26]、头颈

癌^[27]、乳腺癌^[28]、白血病^[29]及非小细胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma, NSCLC)^[30]等。STAT3 作为转录因子, 其过度激活可上调多种靶基因的转录和表达, 包括抗凋亡蛋白 Bcl-xL 和 Bcl-2、增殖相关蛋白 Cyclin D1 和 c-Myc、促血管发生因子 VEGF, 以及侵袭和转移相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 等^[16, 31]。此外, 最新的研究提示, STAT3 不仅在肿瘤细胞中调节致癌基因的表达, 还可以通过免疫抑制来促进人类癌症的发生^[32]。在免疫细胞中, STAT3 的激活能抑制免疫介质并促进免疫抑制因子的产生。因此, STAT3 调节宿主免疫也是促使肿瘤细胞产生的诱因。

2 STAT3 抑制剂与肿瘤治疗

近年来, 以 STAT3 为靶点的抑制剂研究成为抗肿瘤药物研发的热点。目前抑制 STAT3 信号通路有间接和直接两种策略: 间接策略系阻断 STAT3 信号通路的上游分子, 间接抑制 STAT3 的信号转导功能, 如抑制 JAK、Src、Abl、Lyn 等^[33-39]。其中, 靶向 JAK2 激酶的抑制剂一直是科学家们的研究热点, 且其进入临床开发的时间要先于 STAT3 抑制剂。然而大部分抑制剂虽然进入临床, 却并未成功上市, 这是由于这些激酶抑制剂主要作用在酶催化中心, 与其他激酶的结构类似, 易导致脱靶, 故不良反应较大, 不易成药。

与之相比, 直接靶向 STAT3 蛋白的抑制剂更为理想。直接抑制 STAT3 靶点的作用机制主要包括 3 个策略, 即抑制 STAT3 单体的磷酸化、抑制 STAT3-STAT3 二聚体的形成以及抑制进入细胞核内的 STAT3 与 DNA 结合。按照作用位点主要可分为作用在 SH2 结构域、DNA 结合域、N 末端结构域以及 C 末端转录活化结构域的 STAT3 抑制剂。本文以此分类综述 STAT3 抑制剂的抗肿瘤活性及研究进展。

2.1 作用于 SH2 结构域的 STAT3 抑制剂

目前, 大部分 STAT3 抑制剂都是靶向作用于 STAT3 蛋白的 SH2 结构域。SH2 结构域是 STAT3 发挥其生物学功能的重要结构域。该结构域包含着与另一个 STAT3 蛋白结合的口袋, 在 STAT3 蛋白 Y705 位点磷酸化后, 能使两个活化的 STAT3 单体结合形成二聚体, 移入细胞核, 结合 DNA 开启特定靶基因^[8], 该区域一旦被抑制会导致 STAT3 功能的丧失。

研究表明, STAT3 蛋白的 SH2 结构域中有 3 个比较理想的抑制位点^[40]。第 1 个位点是 STAT3 蛋白 pY705 的结合口袋, 主要由极性残基 (如 R609) 组成, 它们可以通过氢键和静电相互作用与配体相结合。第 2 个位点是 pY+1, 由 T620、K626、Q635 和 S636 组

成的疏水性口袋。第 3 个位点是 pY-1, 由 M586、G587、F588、I589 和 S590 组成的疏水性口袋。其中 pY-1 是 STAT3 蛋白所特有的。大部分靶向 SH2 结构域开发的 STAT3 抑制剂至少要与上述三个位点中的两个结合。

2.1.1 肽类及拟肽类 STAT3 抑制剂 肽类及拟肽类 STAT3 抑制剂的主要作用位点为 SH2 结构域, 系以 STAT3 蛋白或糖蛋白 130 (glycoprotein 130, gp130) 上的磷酸化酪氨酸残基及其邻近的氨基酸残基序列为模板设计合成的磷酸肽。该类抑制剂能阻碍两个 STAT3 单体的结合或者 STAT3 与细胞因子或生长因子受体的结合, 从而阻止蛋白的二聚化及核转移, 阻断 STAT3 与 DNA 的结合。

2001 年, Jove 课题组^[41]设计合成了一个由 6 个氨基酸残基构成并且能与 STAT3 蛋白的 SH2 结构域结合的磷酸肽 PpYLKTK (**1**, P: 脯氨酸, L: 亮氨酸, K: 赖氨酸, T: 苏氨酸, 图 3)。该肽能够抑制 STAT3 的 DNA 结合活性 (IC_{50} 为 $235 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。体外实验发现, 该磷酸肽可以与 STAT3 单体形成复合物。由此表明, 磷酸肽 **1** 一旦结合在 SH2 结构域, 能与 STAT3 单体竞争性占据 SH2 结构域上的结合口袋, 从而阻断蛋白的二聚化。进一步研究发现, 磷酸化的酪氨酸残基以及与其相邻的“Y+1”位亮氨酸残基和“Y-1”位的任意氨基酸残基组成的三肽部分 (XpYL, X: 任意氨基酸残基) 是此类肽分子具有 STAT3 抑制活性必须的结构单元, 由此设计了三肽抑制剂 PpYL (**2**), 其抑制 STAT3 二聚化的活性 IC_{50} 为 $182 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在此基础上, 研究者们对化合物 **2** 进行一系列修饰改造, 发现用 4-氨基苯基替换脯氨酸残基的化合物 ISS610 (**3**) 活性明显提升 ($IC_{50} = 42 \pm 23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 其可抑制 STAT3 的 DNA 结合活性, 并能抑制 *v-src* 转染的小鼠成纤维细胞、人乳腺癌及肺癌细胞中 STAT3 的持续性激活^[42]。

在 STAT3 信号转导过程中, 活化的细胞因子和生长因子受体 (如 IL-6R、EGFR 以及 gp130) 与 STAT3 蛋白上的 SH2 结构域结合后可激活 STAT3 蛋白。研究发现, 这些受体蛋白上均含有相同的 YXXQ (Q: 谷氨酰胺) 序列, 这段磷酸肽能够抑制 STAT3 与上述受体的结合, 从而阻断其活化。Ren 等^[43]从 gp130 的磷酸化蛋白中发现了另一个多肽类 STAT3 抑制剂 pYLPQTV (**4**, V: 缬氨酸)。凝胶迁移 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 实验表明, 其抑制 STAT3: DNA 结合活性的 IC_{50} 为 $0.15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Dourlat 等^[44]对 **4** 进行了构效关系研究, 发现“pY”至“pY+3”位

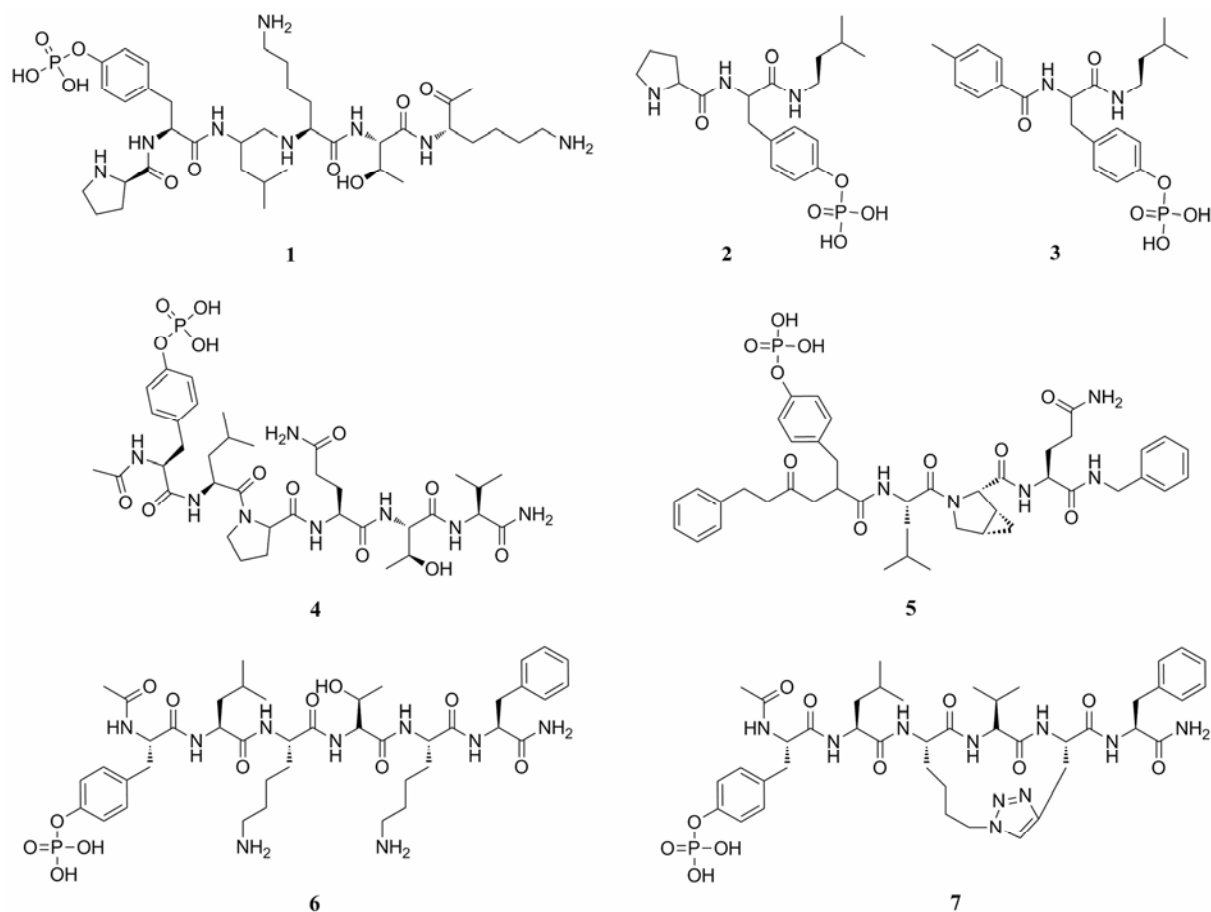


Figure 3 Chemical structures of peptides and peptidomimetics STAT3 inhibitors

的氨基酸残基均能与 STAT3 形成氢键,且“pY+2”位的脯氨酸残基对化合物具有构象限制作用,有利于其与 STAT3 蛋白的结合。随后,该研究小组对化合物 4 进行了大量的结构改造得到化合物 5,对 STAT3 亲和力最强,其抑制 STAT3 与 DNA 结合的 IC_{50} 为 $68 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

此外,Chen 等^[45]还直接以 STAT3 蛋白 pY705 及其相邻的氨基酸残基序列为模板设计了一种短肽,即乙酰基-pYLKTKF (6, F: 苯丙氨酸),发现其与 STAT3 的 SH2 结构域的亲和力较强,对 STAT3 的抑制常数 K_i 为 $25.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,同时可有效地抑制 STATs 蛋白家族的活性。对化合物 6 的 C 端、N 端及“pY+1”“pY+2”位进行结构改造,发现将“pY+2”位替换为 *cis*-3,4-亚甲基脯氨酸时可产生构象限制,从而增强化合物对受体的亲和力^[42, 44, 46, 47]。在 6 的基础上,研究人员经缩合、叠氮化、成环和脱保护基等一系列步骤合成了具有构象限制的大环拟肽类化合物 (7),该化合物与 STAT3 蛋白的亲和力 ($K_i = 7.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 较化合物 6 明显提高。

由此可见,肽类及拟肽类 STAT3 抑制剂主要通

过模拟 STAT3 蛋白或 gp130 上的磷酸化酪氨酸残基及其邻近的氨基酸残基序列,其共同特点是这类磷酸肽具有磷酸化的酪氨酸残基以及与其相邻的“Y+1”位亮氨酸残基和“Y-1”位的任意氨基酸残基组成的肽单位。

2.1.2 作用于 SH2 结构域的 STAT3 小分子抑制剂肽类及拟肽类化合物虽然有较高的生物学活性,但是在体内易代谢失活,且存在生物利用度低、成药性较差等问题。近年来,随着计算机模拟和筛选技术的发展,研究人员通过计算机虚拟筛选、高通量筛选等技术,发现了许多靶向 SH2 的小分子抑制剂。

化合物 STA-21 (8, 图 4) 是通过虚拟筛选发现的第一个 STAT3 小分子抑制剂,其抑制荧光素酶活性的浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[48]。研究发现,其能与 STAT3 的 SH2 结构域结合,并抑制 STAT3 自身的二聚化以及与 DNA 的结合,从而阻断 STAT3 的信号转导通路。对化合物 8 进行结构优化,得到化合物 LLL-3 (9) 和 LLL-12 (10),与 8 相比,它们的细胞渗透性均有明显改善。其中,化合物 10 可显著抑制 STAT3 与 DNA 的结合,对横纹肌肉瘤细胞系的 IC_{50} 为 $1.74 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[49, 50]。

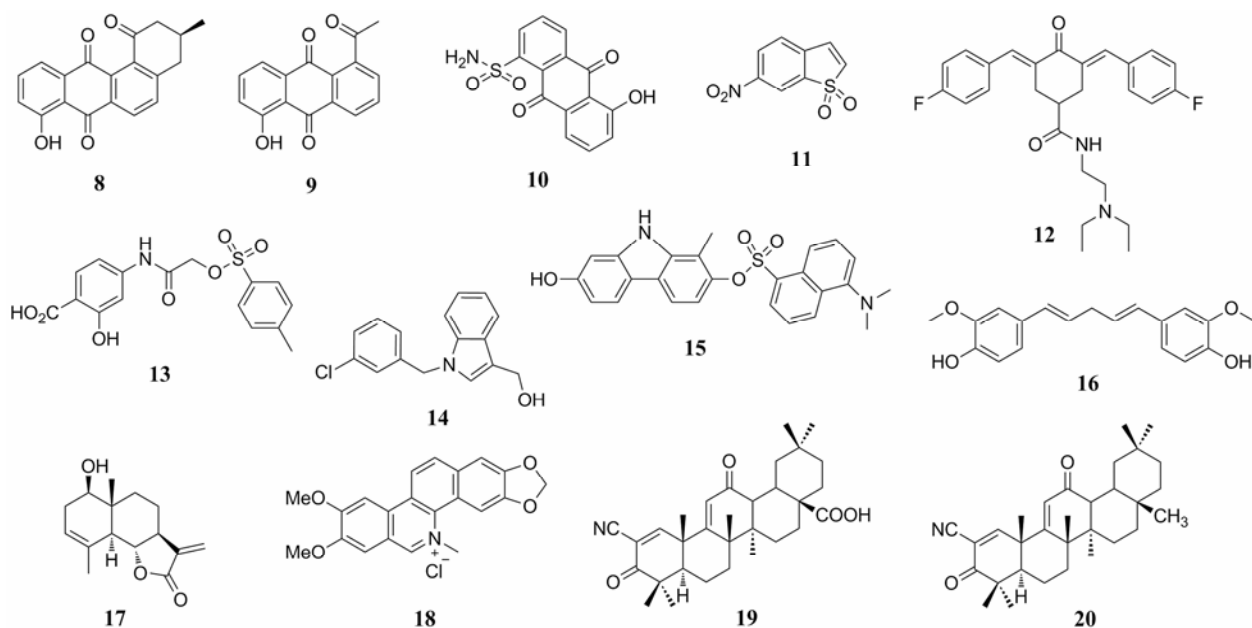


Figure 4 Chemical structures of small molecule STAT3 inhibitors by targeting SH2 domain

Schust 等^[51]通过高通量筛选的方法,发现了另一个作用于 STAT3 蛋白 SH2 结构域的小分子抑制剂 Stattic (11)。荧光偏振实验表明,11 对 STAT3 蛋白结合的 IC_{50} 值为 $5.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,可选择性抑制 STAT3 的活化、二聚化及核转移,诱导 STAT3 依赖性乳腺癌细胞系的凋亡。随后,Zhang 等^[52]发现化合物 11 能抑制 STAT3 活化并下调 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,并且在体内外实验均证实其可增加食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 细胞对放疗的敏感度,是潜在的 ESCC 放疗增敏药物。

2013 年, Kim 等^[53]发现 OPB-31121 可干扰 JAK2/STAT3 通路,下调 JAK2 和 gp130,并抑制 JAK2 和 STAT3 的磷酸化;OPB-31121 可抑制胃癌细胞增殖,诱导其凋亡,抑制抗凋亡蛋白的表达。Brambilla 等^[54]利用对接和分子动力学模拟,并通过分子水平结合实验 ($K_d=10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 STAT3 SH2 结构域的关键氨基酸残基进行定点突变,证明 OPB-31121 作用于 SH2 结构域。与其他 SH2 抑制剂作用机制不同,OPB-31121 可同时抑制 STAT3 蛋白上 Y705 和 S727 的磷酸化。目前,该化合物正在进行实体瘤治疗的 I 期临床研究^[55]。

4-羰基-2,6-二亚苄基环己酮衍生物也是一类 JAK-STAT3 信号通路抑制剂^[56],该类化合物能有效地抑制 STAT3 表达及磷酸化。体外实验表明,化合物 13r (12) 对 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞、A549 肺癌细胞及 DU145 前列腺癌细胞系表现出较强的抗增殖活性 (IC_{50} 值分别为 0.64 、 1.88 、 $1.63 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),对

正常细胞则表现出相对低的细胞毒性。表面等离子共振结合实验证实化合物 12 与 STAT3 的直接相互作用 ($K_d=7.93 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);分子对接结果表明,12 可同时占据 SH2 结构域中的 3 个亚位点 (Y705 位点、L706 位点以及侧面的口袋)。这类化合物的作用靶点仍有待进一步研究。

除了以上列举的 STAT3 抑制剂,研究人员通过虚拟筛选、高通量筛选等技术还发现了许多作用于 SH2 结构域的小分子抑制剂。其中,磺胺类化合物,如 LLL12,在人脐带血管内皮细胞中显著抑制了 STAT3 的磷酸化,且对骨肉瘤细胞呈现出抗肿瘤活性^[57];喹啉酮类化合物,如 S3I-201 (13)^[58],抑制 STAT3-STAT3 二聚体的形成以及 STAT3 与 DNA 的结合与转录活性,从而下调一系列 STAT3 调控基因的表达。此外,13 能够优先抑制 STAT3 持续激活的肿瘤细胞的生长并诱导凋亡。进一步的体内实验表明,其能抑制人乳腺肿瘤的生长;Oncrasin 类化合物,如 NSC-743380 (14)^[59],能够抑制 JAK2/STAT3 磷酸化并抑制下游因子细胞周期蛋白 Cyclin D1 的表达,对来源于人肺癌、结肠癌、卵巢癌、肾癌和乳腺癌的细胞系均具有高度抑制活性 ($GI_{50}\leq 10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$);咪唑类化合物,如化合物 15^[60]以及姜黄素类化合物,如 FLLL11 (16),均能够抑制 IL-6 诱导的 STAT3 磷酸化和核移位^[61,62]。

此外,近年来研究者们已从天然产物中获得了多种具有 STAT3 抑制活性的活性单体。倍半萜内酯类化合物,如 Santamarine (STM, 17)^[63]以及菲啶型生物

碱类化合物, 如氯化两面针碱 (**18**)^[64]能够通过降低 STAT3 705 位酪氨酸的磷酸化来抑制 STAT3 的活化。三萜类化合物 2-氰基-3,12-二氧化齐墩果烷-1,9-二烯-28-酸 (CDDO, **19**) 及其甲酯 CDDO-Me (**20**) 已进入临床阶段, 用于血癌和实体瘤的治疗^[65,66]。研究显示, **20** 能通过抑制 STAT3 信号的转导而抑制乳腺癌细胞的生长, 还可通过抑制 IL-6 的表达和 STAT3 的磷酸化作用杀死多重耐药的卵巢癌细胞^[67,68]。

由此可见, STAT3 小分子抑制剂主要通过虚拟筛选、高通量筛选等多种手段发现, 结构种类比较丰富, 其结构特点主要是以刚性多环结构为母体, 同时环上连接极性基团, 可以形成氢键。另外, 在化合物 **16**、**17**、**19**、**20** 中还有不饱和键, 可以通过加成产生更加牢固的共价键。

综上所述, 自第一个靶向 SH2 结构域的抑制剂报道, 距今已有 17 年的历史^[41]。期间, 科学家们开发了大量的 SH2 抑制剂, 但大多数抑制剂仍处于临床前研究阶段, 且目前没有上市的药物。其主要原因有以下三点: ① 靶向 SH2 结构域的 STAT3 抑制剂主要通过干扰 STAT3 蛋白 Y705 的磷酸化及 STAT3 二聚化发挥作用, 然而 STAT3-STAT3 二聚化是一种蛋白-蛋白相互作用, 由于相互作用面积较大, 用小分子阻断其相互作用, 具有较大困难; ② 目前已开发的小分子抑制剂的活性普遍在微摩级别, 在复杂的人体环境中需要较高的剂量才能达到抑制 STAT3 的效果, 这无疑增加了因药物脱靶效应而对正常组织产生毒性的可能; ③ SH2 结构域在多种酪氨酸蛋白中高度保守, 且其位点正电荷残基富集, 对小分子所携带的负电荷要求较高, 因此针对 SH2 位点设计的抑制剂普遍存在可成药性低、不良反应大等缺点。

研究者们最初认为二聚化是 STAT3 执行功能的必备步骤, 故一直将目光集中在 SH2 结构域。最新文献报道, STAT3 的单体和没有被磷酸化的 STAT3 也可以与其他蛋白相互作用, 调控下游的靶基因的转录, 发挥其相应的生物学功能^[69-72]。因而, 靶向 SH2 结构域可能不足以完全抑制肿瘤细胞内异常的 STAT3 信号, 作用于 SH2 结构域的 STAT3 抑制剂有待更多临床前与临床研究的验证。

2.2 作用于 DNA 结合域的典型 STAT3 抑制剂

DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD) 位于高度保守的第 321~465 位氨基酸之间, 是 STAT3 蛋白与 DNA 结合的重要区域, 具有一定的特异性。该结构域能够使 STAT3 与 DNA 上的启动子反应元件相结合从而来诱导靶基因的表达。其中, STAT3 能够

识别的 DNA 序列为 TTCC(G=C)GGAA^[73]。

2012 年, Buettner 等^[74]在筛选 SH2 抑制剂时发现了化合物 C48 (**21**, 图 5), 然而机制研究中发现, 它并不能与 STAT3 的 SH2 结构域结合。点突变等多种生物化学技术发现 **21** 能够使 STAT3 半胱氨酸 (C468) 上的谷胱甘肽巯基烷基化。进一步研究发现, **21** 能够阻碍肿瘤细胞核中已活化的 STAT3 蛋白的积累, 阻止 STAT3 的过表达, 显著地抑制了小鼠的肿瘤生长。与其他 STATs 相比, C468 是 STAT3 DBD 区所特有的氨基酸残基, 修饰该位点可选择性地阻碍 STAT3 二聚体与 DNA 结合。然而, **21** 除了能对 C468 进行烷基化, 其对细胞里的其他巯基同样有烷基化的作用, 因此特异性较差。

在同一时期, Huang 等^[72]以 DBD 为口袋进行虚拟筛选设计, 发现了小分子抑制剂 inS3-54 (**22**, IC₅₀ 为 13.8 μmol·L⁻¹), 这是第一次针对 DBD 进行 STAT3 抑制剂筛选的尝试。EMSA 实验表明, **22** 可以选择性抑制 STAT3 与 DNA 的结合, 但并不影响 STAT3 的活化和二聚化。此外, 化合物 **22** 可以有效地抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。对化合物 **22** 进行结构优化, 发现了活性更高、特异性更好的小分子 inS3-54A18 (**23**, IC₅₀ 为 4 μmol·L⁻¹)^[75], **23** 与 DBD 结合后可有效抑制 STAT3 下游靶基因的表达。体内实验表明, **23** 可以显著地抑制肺转移瘤的生长和转移。该化合物为后续的靶向 DBD 的 STAT3 小分子抑制剂的研究奠定了基础, 证明了靶向 STAT3 DBD 获得活性分子的可行性。

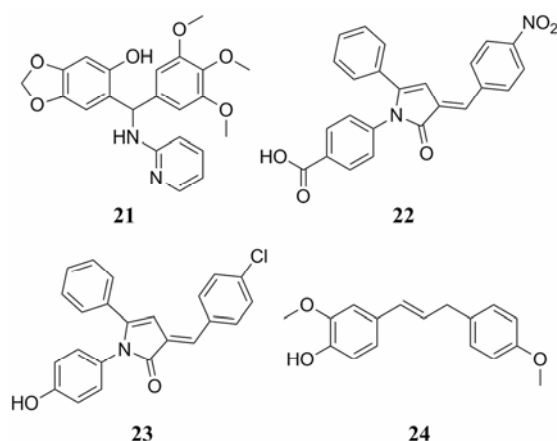


Figure 5 Chemical structures of small molecule inhibitors of STAT3 by binding to DBD

最新研究发现, (E)-2-甲氧基-4-[3-(4-甲氧基苯基)丙-1-烯-1-基]苯酚 (MMPP, **24**) 是靶向 DNA 结合域的 STAT3 抑制剂, 具有潜在的抗肿瘤活性。(E)-2,4-双

(对羟基苯基)-2-丁烯醛 (BHPB) 是一种酪氨酸——果糖美拉德反应产物, 通过抑制 STAT3 的活化发挥其有效的抗炎和抗关节炎的作用。Son 等^[76]对其改造时发现衍生物 **24**, 在 A549 及 NCI-H460 细胞系中均表现出一定的抗肿瘤活性 (IC_{50} 值分别为 12.80、11.99 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。氨基酸残基定点突变实验表明, **24** 直接与 DBD 上 T456 的羟基结合, 从而调控与细胞周期和凋亡有关的基因, 诱导 G1 期细胞周期停滞和凋亡。此外, 体内外实验均发现 **24** 能有效抑制 STAT3 的磷酸化及其与 DNA 结合的活性。化合物 **24** 能否作为靶向 STAT3 的 DBD 的抗癌药物仍在研究中。

综上所述可以发现, 作用于 DBD 的 STAT3 抑制剂主要特点是具有高反应活性的结构, 例如容易进行烷基化的半胱氨酸中的巯基、环氧结构、易发生 Michael 加成的乙烯基砜、 α,β -不饱和酮以及酰胺结构等。目前为止, 对于靶向 STAT3: DNA 结合界面的小分子药物设计仍没有引起研究者们足够的重视。虽然已经有一些靶向 DBD 的小分子抑制剂被开发出来, 但针对这一靶点尚没有统一筛选模型及活性评价方式。从已有化合物的活性来看, 该靶点的小分子抑制剂值得继续关注, 但是其最终药效仍需要临床的检验。

2.3 作用于 N 末端结构域的 STAT3 抑制剂

STAT3 蛋白的 N 末端结构域包含约 130 个氨基酸, 由 8 个螺旋组成^[10, 77]。N 末端结构域主要负责介导 STAT3 二聚体结合到 DNA 位点以及细胞响应所依赖的蛋白质—蛋白质相互作用, 其中包括使邻近的两个 STAT3 二聚体蛋白的结合更紧密, 从而促进了 STAT3 蛋白的四聚化。

2007 年, Timofeeva 等^[77]首次从 STAT3 蛋白的 N-末端结构域的螺旋衍生出一类短肽, 其能特异性地识别并结合 STAT3, 从而在不影响 STAT3 磷酸化状态的前提下抑制其转录活性。将这类短肽与一种透膜蛋白 (Penetratin: RQIKIWFPNRR-Nle-KWKK-NH₂) 融合产生的透膜形式 (Ac-EIKFLEQVDFKY-penetratin) 可以选择性地抑制人 MDA-MB-231、MDA-MB-435 和 MCF-7 乳腺癌细胞的生长, 并诱导凋亡 ($IC_{50} < 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在此基础上, 研究人员合成了一种高选择性的 STAT3 N 末端结构域抑制剂 ST3-Hel2A-2, 该化合物能够高效激活促凋亡基因 CHOP 的表达从而诱导肿瘤细胞的凋亡。这类短肽的发现为 STAT3 抑制剂作为新的抗癌治疗方式提供了一种新策略^[78]。

2.4 作用于 C 末端转录活化结构域的 STAT3 抑制剂

C 末端结构域也被称作转录活化区 (transcription activating domain, TAD), 与基因的转录激活有关。

STAT3 通过该区域与其他转录活化因子和调节因子, 如 p300/CBP、c-Jun 和组蛋白乙酰化转移酶 (HATs) 等的相互作用发挥对靶基因的转录与激活^[79]。在不同的 STATs 亚型中, 该结构域的差异较大, 故抑制 C 末端结构域可能会达到较高的选择性。

最近, Huang 等^[80]基于蛋白结构的精准变构药物筛选设计方法, 成功发现了 STAT3 的变构位点及变构抑制剂。研究人员发现除了 STAT3 蛋白的 SH2 结构域, 在其 C 末端结构域区域也存在着可以抑制 STAT3 二聚化进而调控 DNA 转录的位点 (D171、N175、Q202 和 M213), 并在此位点上精准筛选到变构活性小分子 K116 (**25**, 图 6)。**25** 对 STAT3 的 IC_{50} 达到 $7.99 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

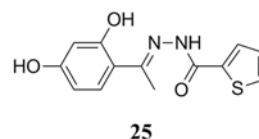


Figure 6 Chemical structure of small molecule inhibitor of STAT3 by binding to C-terminal domain

3 结语与展望

STAT3 在多种肿瘤细胞中异常活化与表达, 且其水平与肿瘤分化程度、浸润转移及预后密切相关。随着对 STAT3 通路的不断研究, STAT3 可作为肿瘤治疗的一个重要的药物靶点这一观点已经得到了科学家的证实, 将 STAT3 抑制剂作为治疗肿瘤的研究具有很大的发展潜力。当然, 目前针对 STAT3 抑制剂抗肿瘤的研究主要还停留在体外活性初筛的水平, 在动物体内进行的药理和毒理研究较少, 进入临床研究阶段的化合物更是寥寥无几 (表 1、2)。STAT3 抑制剂作为一类潜在的新型抗肿瘤药, 其从科学研究到临床应用之间还有一定的距离。尽管针对 SH2 结构域的抑制剂已被广泛报道, 但普遍存在活性低、选择性差等问题。针对 DBD、N 末端结构域和 C 末端结构域抑制剂已经有了一定的突破, 并表现出一定的优势, 这些研究都为 STAT3 抑制剂的设计提供了新的思路。对于 STAT3 抑制剂开发来说, 对 DBD、N 末端结构域和 C 末端结构域的探索具有较大的研究空间, 药物化学工作者应该关注上述 3 个结构域的小分子抑制剂的研发。虽然目前还没有 STAT3 抑制剂上市, 但相信随着研究的深入, 药物设计方法的不断优化以及靶向 STAT3 其他结构域的小分子抑制剂不断研究, 可以更高效地发现 STAT3 小分子抑制剂, 为肿瘤的治疗提供新的解决办法和思路。

Table 1 Known STAT3 inhibitors identified to date, their modes of action, cellular effects and tumor models tested. DBD: DNA binding domain; ND: N-terminal domain; CD: C-terminal domain; n/d: Not determined

Inhibitor	Year	Target site	Mode of targeting STAT3	Cell line tested	Xenograft tumor model	Ref.
PpYLKTK	2001	SH2	Dimerization	NIH3T3/v-Src	n/d	[41]
pYLPQTV	2003	SH2	Dimerization	n/d	n/d	[43]
Acetyl-pYLKTKF	2007	SH2	Dimerization	n/d	n/d	[45]
STA-21	2009	SH2	Dimerization	DU145, PC3, MCF-7	n/d	[48]
Stattic	2006	SH2	Phosphorylation	HepG2, MDA-MB-435, MDA-MB-231	n/d	[51, 52]
OPB-31121	2013	SH2	Phosphorylation	SNU1, SNU484, AGS, NCI-N87, SNU16, SNU216, SNU601, SNU620, SNU638, SNU668, SNU719, SNU5	SNU484	[53]
13r	2016	SH2	Phosphorylation	MDA-MB-231, A549, DU145	n/d	[56]
LLL12	2012	SH2	Phosphorylation	MDA-MB-231, U87, PANC-1, HPAC, SK-BR-3, U373	OS-1	[57]
S3I-201	2007	SH2	Dimerization	NIH 3T3/v-Src, NIH 3T3, MDA-MB-453, MDA-MB-435, MDA-MB-231, MDA-MB-468	MDA-MB-231	[58]
NSC-743380	2011	SH2	Phosphorylation	MCF-7, A498, 786-O, MDA-MB-231	A498	[59]
Carbazole derivatives	2014	SH2	Phosphorylation	A431, A549, PC3	SUM149, A549	[60]
FLLL11	2009	SH2	Phosphorylation	MDA-MB-468, SK-BR-3, BT-474, MDA-MB-231, MDA-MB-453, HCT116, SW480, MCF-7, PC3, DU145, HT29	n/d	[61, 62]
STM	2017	SH2	Phosphorylation	A549, H1650, NL-20	n/d	[63]
Nitidine chloride	2017	SH2	Phosphorylation	HSC3, HSC4	HSC3	[64]
CDDO-Me	2007	SH2	Phosphorylation	4T1	n/d	[67, 68]
C48	2011	DBD	DNA-binding	MDA-MB-468, MDA-MB-231	MDA-MB-468, C3L5	[74]
inS3-54 & analogs	2014	DBD	DNA-binding	A549, H1299, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF10A1, IMR90	A549	[72, 75]
MMPP	2017	DBD	DNA-binding	A549, NCI-H460	NCI-H460, PDX	[76]
Peptides	2007	ND	Transcriptional activity	MDA-MB-231, MDA-MB-435, MCF-7	n/d	[77]
ST3-Hel2A-2	2013	ND	Transcriptional activity	DU145, LNCaP, PC3, RWPE-1, HMEC	n/d	[78]
K116	2018	CD	Dimerization	n/d	n/d	[80]

Table 2 Inhibitors that have therapeutic effects on STAT3 in animal experiments. DBD: DNA binding domain; ND: N-terminal domain; CD: C-terminal domain; n/d: Not determined; ig: Intragastric administration; ip: Intraperitoneal injection; iv: Intravenous injection

Inhibitor	Year	Target site	Mechanism of inhibiting STAT3 function	Xenograft tumor model	Dosage/mg·kg ⁻¹	Treatment time and path	Ref.
OPB-31121	2013	SH2	Phosphorylation	SNU484	30, 60, 100	daily for 17 days, ig	[53]
LLL12	2012	SH2	Phosphorylation	OS-1	5	daily for 6 weeks, ip	[57]
S3I-201	2007	SH2	Dimerization	MDA-MB-231	5	2 or 3 times a week for 2 weeks, iv	[58]
NSC-743380	2011	SH2	Phosphorylation	A498	67, 100, 150	daily for 2 weeks, ip	[59]
Carbazole derivatives	2014	SH2	Phosphorylation	SUM149 A549	10, 30 10	every other day for 5 days, ip every other day for 27 days, ip	[60]
Nitidine chloride	2017	SH2	Phosphorylation	HSC3	10	daily for 24 days, ip	[64]
C48	2011	DBD	DNA-binding	MDA-MB-468	200	five times a week for 8 weeks, ip	[74]
inS3-54 A18	2014	DBD	DNA-binding	A549	200	2 or 3 times a week for 4 weeks, ig	[72, 75]
MMPP	2017	DBD	DNA-binding	NCI-H460 PDX	2.5, 5 5 5	twice a week for 3 weeks, ip three times a week for 3 weeks, ig three times a week for 1 month, ig	[76]

References

[1] Takeda K, Noguchi K, Shi W, et al. Targeted disruption of the mouse *Stat3* gene leads to early embryonic lethality [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94: 3801–3804.

[2] Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 4806–4810.

[3] Xiong A, Yang Z, Shen Y, et al. Transcription factor STAT3 as a novel molecular target for cancer prevention [J]. *Cancers*, 2014, 6: 926–957.

[4] Paukku K, Silvennoinen O. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from

- STAT5 [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15: 435–455.
- [5] Hevehan DL, Miller WM, Papoutsakis ET. Differential expression and phosphorylation of distinct STAT3 proteins during granulocytic differentiation [J]. *Blood*, 2002, 99: 1627–1637.
- [6] Benekli M, Baer MR, Baumann H, et al. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias [J]. *Blood*, 2003, 101: 2940–2954.
- [7] Dumoutier L, de Meester C, Tavernier J, et al. New activation modus of STAT3: a tyrosine-less region of the interleukin-22 receptor recruits STAT3 by interacting with its coiled-coil domain [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 26377–26384.
- [8] Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by STAT1 and STAT3 requires both tyrosine and serine phosphorylation [J]. *Cell*, 1995, 82: 241–250.
- [9] Ren Z, Mao X, Mertens C, et al. Crystal structure of unphosphorylated STAT3 core fragment [C]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374: 1–5.
- [10] Becker S, Groner B, Muller CW. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA [J]. *Nature*, 1998, 394: 145–151.
- [11] Carlesso N, Frank DA, Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl [J]. *J Exp Med*, 1996, 183: 811–820.
- [12] Ilaria RL Jr, Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 31704–31710.
- [13] Frank DA, Varticovski L. BCR/abl leads to the constitutive activation of STAT proteins, and shares an epitope with tyrosine phosphorylated Stats [J]. *Leukemia*, 1996, 10: 1724–1730.
- [14] Nieborowska-Skorska M, Wasik MA, Slupianek A, et al. Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis [J]. *J Exp Med*, 1999, 189: 1229–1242.
- [15] Ihle JN. The Janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling [J]. *Semin Immunol*, 1995, 7: 247–254.
- [16] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 798–809.
- [17] Wang Y, Ning H, Ren F, et al. Gdx/UBL4A specifically stabilizes the TC45/STAT3 association and promotes dephosphorylation of STAT3 to repress tumorigenesis [J]. *Mol Cell*, 2014, 53: 752–765.
- [18] Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins [J]. *Science*, 1994, 264: 1415–1421.
- [19] Schindler C, Darnell JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway [J]. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64: 621–651.
- [20] Danial NN, Pernis A, Rothman PB. Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene [J]. *Science*, 1995, 269: 1875–1877.
- [21] Jove R, Kornbluth S, Hanafusa H. Enzymatically inactive p60c-src mutant with altered ATP-binding site is fully phosphorylated in its carboxy-terminal regulatory region [J]. *Cell*, 1987, 50: 937–943.
- [22] Ren F, Geng Y, Minami T, et al. Nuclear termination of STAT3 signaling through SIPAR (STAT3-interacting protein as a repressor)-dependent recruitment of T cell tyrosine phosphatase TC-PTP [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589: 1890–1896.
- [23] Yamamoto T, Sekine Y, Kashima K, et al. The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297: 811–817.
- [24] Huang M, Page C, Reynolds RK, et al. Constitutive activation of STAT3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells [J]. *Gynecol Oncol*, 2000, 79: 67–73.
- [25] Sun Y, Yang S, Sun N, et al. Differential expression of STAT1 and p21 proteins predicts pancreatic cancer progression and prognosis [J]. *Pancreas*, 2014, 43: 619–623.
- [26] Liao Z, Nevalainen MT. Targeting transcription factor STAT5a/b as a therapeutic strategy for prostate cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2011, 3: 133–138.
- [27] Cohen-Kaplan V, Jrbashyan J, Yanir Y, et al. Heparanase induces signal transducer and activator of transcription (STAT) protein phosphorylation: preclinical and clinical significance in head and neck cancer [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 6668–6678.
- [28] Barash I. STAT5 in breast cancer: potential oncogenic activity coincides with positive prognosis for the disease [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33: 2320–2325.
- [29] Sanchez-Ceja SG, Reyes-Maldonado E, Vazquez-Manriquez ME, et al. Differential expression of STAT5 and Bcl-xL, and high expression of Neu and STAT3 in non-small-cell lung carcinoma [J]. *Lung Cancer*, 2006, 54: 163–168.
- [30] Casetti L, Martin-Lanneree S, Najjar I, et al. Differential contributions of STAT5A and STATB to stress protection and tyrosine kinase inhibitor resistance of chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells [J]. *Cancer Res*, 2013, 73:

- 2052–2058.
- [31] Germain D, Frank DA. Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 3: 5665–5669.
- [32] Wang Y, Shen Y, Wang S, et al. The role of STAT3 in leading the crosstalk between human cancers and the immune system [J]. *Cancer Lett*, 2018, 415: 117–128.
- [33] Li SQ, Cheuk AT, Shern JF, et al. Targeting wild-type and mutationally activated FGFR4 in rhabdomyosarcoma with the inhibitor ponatinib (AP24534) [J]. *PLoS One*. 2013, 8: e76551. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0076551>.
- [34] Ferrajoli A, Faderl S, Van Q, et al. WP1066 disrupts Janus kinase-2 and induces caspase-dependent apoptosis in acute myelogenous leukemia cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 11291–11299.
- [35] Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E, et al. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 2435–2444.
- [36] Oyaizu T, Fung SY, Shiozaki A, et al. Src tyrosine kinase inhibition prevents pulmonary ischemia-reperfusion-induced acute lung injury [J]. *Intensive Care Med*, 2012, 38: 894–905.
- [37] Gangadhar TC, Clark JI, Karrison T, et al. Phase II study of the Src kinase inhibitor saracatinib (AZD0530) in metastatic melanoma [J]. *Invest New Drugs*, 2013, 31: 769–773.
- [38] Antonarakis ES, Heath EI, Posadas EM, et al. A phase 2 study of KX2-391, an oral inhibitor of Src kinase and tubulin polymerization, in men with bone-metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71: 883–892.
- [39] Sun X, Li B, Xie B, et al. DCZ3301, a novel cytotoxic agent, inhibits proliferation in diffuse large B-cell lymphoma *via* the STAT3 pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e3111. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5680593>.
- [40] Kraskouskaya D, Duodu E, Arpin CC, et al. Progress towards the development of SH2 domain inhibitors [J]. *Chem Soc Rev*, 2013, 21: 3337–3370.
- [41] Turkson J, Ryan D, Kim JS, et al. Phosphotyrosyl peptides block STAT3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 45443–45455.
- [42] Turkson J, Kim JS, Zhang S, et al. Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3: 261–269.
- [43] Ren Z, Cabell LA, Schaefer TS, et al. Identification of a high-affinity phosphopeptide inhibitor of STAT3 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 633–636.
- [44] Doulat J, Valentin B, Liu WQ, et al. New syntheses of tetrazolymethylphenylalanine and *O*-malonyltyrosine as pTyr mimetics for the design of STAT3 dimerization inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 3943–3946.
- [45] Chen J, Nikolovska-Coleska Z, Yang CY, et al. Design and synthesis of a new, conformationally constrained, macrocyclic small-molecule inhibitor of STAT3 *via* 'click chemistry' [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 3939–3942.
- [46] Mandal PK, Limbrick D, Coleman DR, et al. Conformationally constrained peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription. 3: Evaluation and molecular modeling [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 2429–2442.
- [47] Mandal PK, Heard PA, Ren Z, et al. Solid-phase synthesis of STAT3 inhibitors incorporating *O*-carbamoylserine and *O*-carbamoylthreonine as glutamine mimics [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 654–656.
- [48] Song H, Wang R, Wang S, et al. A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits STAT3 function in breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 4700–4705.
- [49] Wei CC, Ball S, Lin L, et al. Two small molecule compounds, LLL12 and FLLL32, exhibit potent inhibitory activity on STAT3 in human rhabdomyosarcoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2010, 38: 279–285.
- [50] Fuh B, Sobo M, Cen L, et al. LLL-3 inhibits STAT3 activity, suppresses glioblastoma cell growth and prolongs survival in a mouse glioblastoma model [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100: 106–112.
- [51] Schust J, Sperl B, Hollis A, et al. Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization [J]. *Chem Biol*, 2006, 13: 1235–1242.
- [52] Zhang Q, Zhang C, He J, et al. STAT3 inhibitor static enhances radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36: 2135–2142.
- [53] Kim MJ, Nam HJ, Kim HP, et al. OPB-31121, a novel small molecular inhibitor, disrupts the JAK2/STAT3 pathway and exhibits an antitumor activity in gastric cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2013, 335: 145–152.
- [54] Brambilla L, Genini D, Laurini E, et al. Hitting the right spot: mechanism of action of OPB-31121, a novel and potent inhibitor of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) [J]. *Mol Oncol*, 2015, 9: 1194–1206.
- [55] Oh DY, Lee SH, Han SW, et al. Phase I study of OPB-31121,

- an oral STAT3 inhibitor, in patients with advanced solid tumors [J]. *Cancer Res Treat*, 2015, 47: 607–615.
- [56] Ji P, Yuan C, Ma S, et al. 4-Carbonyl-2,6-dibenzylidencyclohexanone derivatives as small molecule inhibitors of STAT3 signaling pathway [J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24: 6174–6182.
- [57] Bid HK, Oswald D, Li C, et al. Anti-angiogenic activity of a small molecule STAT3 inhibitor LLL12 [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e35513. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035513>.
- [58] Siddiquee K, Zhang S, Guida WC, et al. Selective chemical probe inhibitor of STAT3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 7391–7396.
- [59] Guo W, Wu S, Wang L, et al. Antitumor activity of a novel oncrasin analogue is mediated by JNK activation and STAT3 inhibition [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e28487. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0028487>.
- [60] Hou S, Yi YW, Kang HJ, et al. Novel carbazole inhibits phospho-STAT3 through induction of protein-tyrosine phosphatase PTPN6 [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 6342–6353.
- [61] Lin L, Hutzen B, Ball S, et al. New curcumin analogues exhibit enhanced growth-suppressive activity and inhibit AKT and signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation in breast and prostate cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100: 1719–1727.
- [62] Cen L, Hutzen B, Ball S, et al. New structural analogues of curcumin exhibit potent growth suppressive activity in human colorectal carcinoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 99.
- [63] Mehmood T, Maryam A, Tian X, et al. Santamarine inhibits NF- κ B activation and induces mitochondrial apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells *via* oxidative stress [J]. *J Cancer*, 2017, 8: 3707–3717.
- [64] Kim LH, Khadka S, Shin JA, et al. Nitidine chloride acts as an apoptosis inducer in human oral cancer cells and a nude mouse xenograft model *via* inhibition of STAT3 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 91306–91315.
- [65] Vannini N, Lorusso G, Cammarota R, et al. The synthetic oleanane triterpenoid, CDDO-methyl ester, is a potent antiangiogenic agent [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 3139–3146.
- [66] Liby KT, Royce DB, Risingsong R, et al. Synthetic triterpenoids prolong survival in a transgenic mouse model of pancreatic cancer [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3: 1427–1434.
- [67] Ling X, Konopleva M, Zeng Z, et al. The novel triterpenoid C-28 methyl ester of 2-cyano-3,12-dioxoolen-1,9-dien-28-oic acid inhibits metastatic murine breast tumor growth through inactivation of STAT3 signaling [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 4210–4218.
- [68] Duan Z, Ames RY, Ryan M, et al. CDDO-Me, a synthetic triterpenoid, inhibits expression of IL-6 and STAT3 phosphorylation in multi-drug resistant ovarian cancer cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 63: 681–689.
- [69] Yang J, Liao X, Agarwal MK, et al. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NF κ B [J]. *Genes Dev*, 2007, 21: 1396–1408.
- [70] Nkansah E, Shah R, Collie GW, et al. Observation of unphosphorylated STAT3 core protein binding to target dsDNA by PEMSA and X-ray crystallography [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587: 833–839.
- [71] Timofeeva OA, Chasovskikh S, Lonskaya I, et al. Mechanisms of unphosphorylated STAT3 transcription factor binding to DNA [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 14192–14200.
- [72] Huang W, Dong Z, Wang F, et al. A small molecule compound targeting STAT3 DNA-binding domain inhibits cancer cell proliferation, migration, and invasion [J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 1188–1196.
- [73] Yang E, Henriksen MA, Schaefer O, et al. Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a STAT1 linker mutant [J]. *Biol Chem*, 2002, 277: 13455–13462.
- [74] Buettner R, Corzano R, Rashid R, et al. Alkylation of cysteine 468 in STAT3 defines a novel site for therapeutic development [J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 6: 432–443.
- [75] Huang W, Dong Z, Chen Y, et al. Small-molecule inhibitors targeting the DNA-binding domain of STAT3 suppress tumor growth, metastasis and STAT3 target gene expression *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2015, 35: 783–792.
- [76] Son DJ, Zheng J, Jung YY, et al. MMPP attenuates non-small cell lung cancer growth by inhibiting the STAT3 DNA-binding activity via direct binding to the STAT3 DNA-binding domain [J]. *Theranostics*, 2017, 7: 4632–4642.
- [77] Timofeeva OA, Gaponenko V, Lockett SJ, et al. Rationally designed inhibitors identify STAT3 N-domain as a promising anticancer drug target [J]. *ACS Chem Biol*, 2007, 2: 799–809.
- [78] Timofeeva OA, Tarasova NI, Zhang X, et al. STAT3 suppresses transcription of proapoptotic genes in cancer cells with the involvement of its N-terminal domain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 1267–1272.
- [79] Levy DE, Darnell JE Jr. STATs: transcriptional control and biological impact [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 651–662.
- [80] Huang M, Song K, Liu X. AlloFinder: a strategy for allosteric modulator discovery and allosterome analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 46: W451–W458.