

## IL-6/JAK/STAT3 信号通路抑制剂细胞筛选模型的验证和应用

季 鸣<sup>1</sup>, 薛妮娜<sup>1</sup>, 黄 蕊<sup>1</sup>, 刘羿晨<sup>2</sup>, 金 晶<sup>1</sup>, 陈晓光<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室/创新药物非临床药物代谢及 PK/PD 研究北京市重点实验室, 北京 100050; 2. 哈尔滨商业大学, 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150028)

**摘要:** IL-6/JAK/STAT3 是细胞内调节细胞生长、存活和分化的重要信号通路, 这条信号通路也控制着 T 淋巴细胞的分化和激活。IL-6/JAK/STAT3 信号通路的异常与自身免疫性疾病和肿瘤密切相关, 已经成为药物研发的热门靶点。本研究利用 Invivogen 公司稳定表达 IL-6 受体且可与 STAT3 结合的分泌胚胎碱性磷酸酶 (secreted embryonic alkaline phosphatase, SEAP) 报告基因的 HEK-Blue IL-6 细胞, 给予 IL-6 刺激下分泌 SEAP, 通过与 QUANTI-Blue 反应, 在 655 nm 检测 SEAP 的生成量, 评价化合物对 IL-6 刺激的 STAT3 信号通路的抑制作用。结果表明, IL-6 可特异性地激活 HEK-Blue IL-6 细胞。在细胞数为  $5 \times 10^4$  个/孔、 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度 IL-6 刺激 20 h, 并于 QUANTI-Blue 反应 1 h 时检测 OD<sub>655</sub> 吸光度值为最佳反应条件。在筛选的 14 个天然产物中, 牛蒡子苷元、隐丹参酮和姜黄素具有很强的抑制 STAT3 信号通路的活性, IC<sub>50</sub> 值分别为 1.28、2.96 和  $6.61 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该 HEK-Blue IL-6 细胞模型适用于 IL-6/JAK/STAT3 信号通路抑制剂的筛选。

**关键词:** 白细胞介素 6; 双面神激酶; 信号转导及转录激活蛋白 3; 筛选模型; 抑制剂

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 05-0749-05

## Validation and application a cell-based screening model for IL-6/JAK/STAT3 inhibitor

Ji Ming<sup>1</sup>, Xue Ni-na<sup>1</sup>, Huang Rui<sup>1</sup>, Liu Yi-chen<sup>2</sup>, Jin Jing<sup>1</sup>, Chen Xiao-guang<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines/Beijing Key Laboratory of Non-Clinical Drug Metabolism and PK/PD Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China;

2. Center of Research and Development on Life Sciences and Environment Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China)

**Abstract:** Interleukin-6 (IL-6)/janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) is a pivotal signaling pathway in the regulation of cell proliferation, survival, differentiation and T cell activation. Aberration of this pathway is involved in multiple autoimmunity diseases and cancers, therefore the pathway is considered as a hot target for drug development. In our study, we validated a cell-based model of IL-6/JAK/STAT3 and used it in screening of its inhibitors. HEK-Blue IL-6 cells of Invivogen Inc. were used to stably express IL-6 receptor and STAT3-induced secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) report gene. After stimulation by IL-6, SEAP was secreted from cells and reacted with QUANTI-Blue. The product can be detected at 655 nm. The inhibitory effect of compounds on STAT3 signaling showed as IC<sub>50</sub> was calculated by OD value. The results shown that IL-6 specifically activated the cells, which could be applied to screen the inhibitors for IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway. The optimized screening conditions were described as below: 50 000 cells/well,  $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  IL-6 incubation for 20 h and reaction with QUANTI-Blue for 1 h. Based

收稿日期: 2018-01-18; 修回日期: 2018-03-06.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (2017-I2M-1-010).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165207, E-mail: chxg@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0072

on this condition, we screened 14 natural products based on this cell model and arctigenin, cryptotanshinone and curcumin showed potential inhibitory activities on STAT3 signaling pathway with  $IC_{50}$  of 1.28, 2.96 and  $6.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Our study suggests that HEK-Blue IL-6 cells were suitable for screening inhibitors for the IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway.

**Key words:** interleukin-6; janus kinase; signal transducers and activators of transcription 3; screening model; inhibitor

信号转导与转录活化因子 STAT3 (signal transducers and activators of transcription 3) 是细胞内重要的信号转导分子, 在细胞存活、增殖及免疫细胞激活中起重要调节作用。在细胞内, STAT3 可被多种激酶磷酸化后, 形成同源或与 STAT 家族其他成员形成异源二聚体, 进而从细胞质转入细胞核, 启动下游基因的转录。磷酸化 STAT3 的激酶包括 JAK (janus kinase) 激酶、Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase) 激酶等<sup>[1]</sup>。STAT3 可被多种细胞因子 (如 IL-6) 和生长因子 (如 EGF) 等活化。其中, IL-6/JAK/STAT3 信号通路是最主要的信号通路, 该通路的异常活化不仅与多种肿瘤的发生发展密切相关, 也与自身免疫性疾病有关<sup>[2-5]</sup>。针对 IL-6 及其受体、JAK 的抑制剂已获得上市批准用于自身免疫性疾病的治疗<sup>[6-11]</sup>。而已有研究表明, STAT3 是潜在的药物治疗靶点<sup>[12, 13]</sup>, 目前已有一些候选化合物进入临床研究<sup>[14-17]</sup>。因此, 开发靶向 IL-6/JAK/STAT3 信号通路的抑制剂, 对研发新型抗肿瘤药物和抗自身免疫性炎症药物具有重要的意义。

为了筛选新型的 IL-6/JAK/STAT3 信号通路抑制剂, 本研究利用了 Invivogen 公司的 HEK-Blue IL-6 细胞。HEK-Blue IL-6 细胞不仅稳定表达 IL-6 受体, 而且还具有分泌型胚胎碱性磷酸酶 (secreted embryonic alkaline phosphatase, SEAP) 的报告基因, 该报告基因含有可与 STAT3 结合的位点。在 IL-6 的刺激下, 细胞质内磷酸化的 STAT3 形成二聚体转位进入细胞核, 结合到 SEAP 报告基因上启动转录, 最终产生可分泌到细胞外的 SEAP, 其 SEAP 含量可通过与 QUANTI-Blue 反应在波长 655 nm 下检测。本研究利用 HEK-Blue IL-6 细胞, 优化了用于筛选 IL-6/JAK/STAT3 信号通路抑制剂的最佳条件, 并对 14 个天然产物进行了 STAT3 信号通路活性的筛选。

## 材料与方法

**细胞** HEK-Blue IL-6 Cells 购自法国 Invivogen 公司。

**试剂与药物** 人 IL-6 重组蛋白、人 IL-17A 重组蛋白、人 IL-6 中和单抗 (anti-hIL-6-IgG)、QUANTI-

Blue 和 HEK-Blue Selection 购自法国 Invivogen 公司; 人 IL-17F 和 TNF- $\alpha$  重组蛋白购自美国 PeproTech 公司。和厚朴酚、槲皮素、木犀草苷、菊苣素、迷迭香酸、金丝桃苷、松果菊苷、木犀草素、洋蓟素、姜黄素、隐丹参酮、槲皮素苷和咖啡酸均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。牛蒡子苷元由鲁南制药提供。

**仪器** Biotek 全波长酶标仪 (美国)。

**细胞培养** 参照 HEK-Blue IL-6 细胞培养说明书, 细胞在含  $1\times$ HEK-Blue Selection 抗生素和 10% FBS ( $56^\circ\text{C}$  灭活 30 min, 除去血清中的碱性磷酸酶) 的 DMEM 培养基中贴壁生长, 待细胞密度达到 70%~80% 时进行传代。

**细胞检测** 待细胞密度达到 80% 时, 将贴壁生长的细胞轻轻拍下 (勿用胰酶消化或将细胞吹打) 后,  $1200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 用  $37^\circ\text{C}$  预热的完全培养基重悬并进行计数。采用无菌 96 孔细胞培养板, 每孔加入完全培养基或不同浓度的细胞因子  $20 \mu\text{L}$ , 之后加入细胞悬液 (每孔最终细胞数为  $2.5\times 10^4$  或  $5\times 10^4$  个)  $180 \mu\text{L}$ , 在  $37^\circ\text{C}$  细胞培养箱孵育不同时间。从该 96 孔板中每孔吸取  $20 \mu\text{L}$  溶液平行转移至另一块 96 孔板, 加入  $37^\circ\text{C}$  预热的 QUANTI-Blue 显色液  $180 \mu\text{L}$ , 在  $37^\circ\text{C}$  孵育不同时间后, 于 655 nm 波长下进行检测。

**化合物筛选** 参照上述方法, 每孔加入 IL-6 细胞因子 (终质量浓度  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )  $20 \mu\text{L}$ 、不同浓度的 IL-6 中和性抗体或天然产物 (0.1、0.25、0.5、1、2.5、5 和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $20 \mu\text{L}$  及细胞悬液 (每孔最终细胞数为  $5\times 10^4$  个)  $160 \mu\text{L}$ , 共  $200 \mu\text{L}$  体系。阴性对照组为  $40 \mu\text{L}$  完全培养基和  $160 \mu\text{L}$  细胞悬液; 阳性对照组为 IL-6 细胞因子 (终质量浓度  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )  $20 \mu\text{L}$ 、完全培养基  $20 \mu\text{L}$  和细胞悬液  $160 \mu\text{L}$ 。在  $37^\circ\text{C}$  细胞培养箱孵育 20 h。从 96 孔板中每孔吸取  $20 \mu\text{L}$  溶液转移至另一块 96 孔板中, 加入  $37^\circ\text{C}$  预热的 QUANTI-Blue 显色液  $180 \mu\text{L}$ , 在  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h 后, 于 655 nm 波长下进行检测。

**数据处理** 所有实验均至少重复 3 次, 数据以平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 由 Excel 进行数据处理

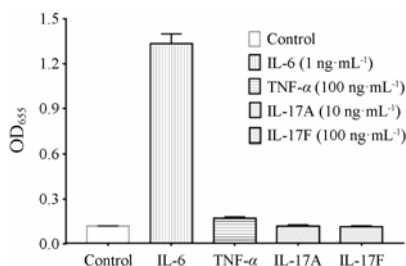
理, 并使用 Graphpad Prism 计算  $IC_{50}$  和作图。抑制率 (%) =  $[1 - (OD_{test} - OD_{NC}) / (OD_{PC} - OD_{NC})] \times 100\%$ 。其中, test 为待测化合物, NC 为阴性对照组, PC 为阳性对照组。

## 结果

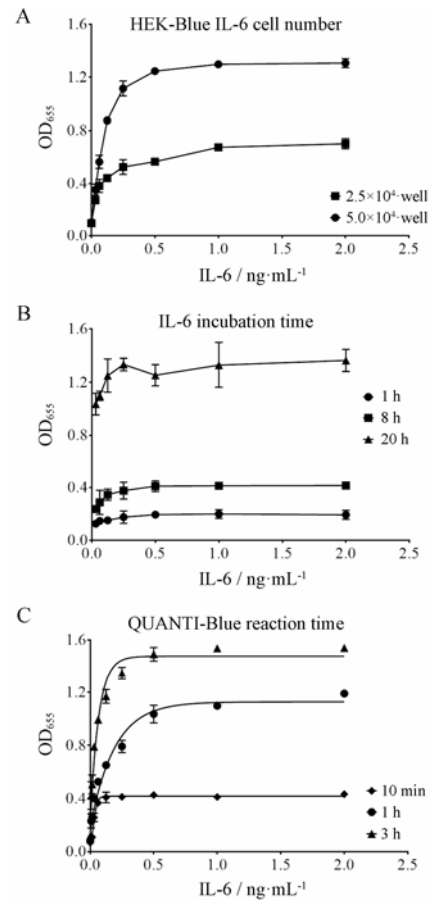
### 1 模型的验证

为了验证细胞的反应性和特异性, 首先检测了 HEK-Blue IL-6 细胞对人 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-17A 和 IL-17F 四种细胞因子的反应性。在这 4 种细胞因子处理细胞 20 h 后进行检测, 由图 1 可见, IL-6 可通过激活 STAT3 促使 STAT3 结合的 SEAP 报告基因转录, 产生 SEAP, 而 TNF- $\alpha$ 、IL-17A 和 IL-17F 在这株细胞上对 STAT3 的激活无明显影响。在此基础上, 从 HEK-Blue IL-6 细胞数量、IL-6 作用时间及 QUANTI-Blue 反应时间 3 个方面进一步摸索了这株细胞的最佳反应条件。在 96 孔板每孔  $2.5 \times 10^4$  和  $5 \times 10^4$  个细胞的条件下, 使用 IL-6 作用细胞 20 h, 随着 IL-6 浓度的增加,  $5 \times 10^4$  个细胞/孔的反应值明显优于  $2.5 \times 10^4$  个细胞/孔的反应值, 且达到了理想检测范围 (图 2A)。在固定细胞数为  $5 \times 10^4$  个/孔的前提下, 给予 IL-6 作用细胞不同时间, 由图 2B 可见, 随着 IL-6 作用时间的延长, 反应值不断增加, IL-6 作用 20 h 的反应值明显优于 1 和 8 h, 并且 IL-6 在  $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度下即可达到最大反应值。最后, 在固定细胞数为  $5 \times 10^4$  个/孔和 IL-6 作用 20 h 的前提下, 又检测了显色液 QUANTI-Blue 的反应时间, 随着时间增加, 细胞的反应值也不断增加, 且 QUANTI-Blue 反应 1 h 后, 即可达到理想的检测范围 (图 2C)。因此, 最终选择每孔  $5 \times 10^4$  个细胞、 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  IL-6 处理 20 h 和 QUANTI-Blue 反应 1 h 作为该细胞模型的最佳反应条件。

在确定细胞最佳反应条件的基础上, 为了验证该细胞是否可以用于筛选 IL-6/JAK/STAT3 信号通路的抑制剂, 本研究使用了 IL-6 的中和性抗体处理该



**Figure 1** The response of HEK-Blue IL-6 cells to different cytokines.  $5 \times 10^4$  cells/well, cytokine incubation for 20 h, reaction time of QUANTI-Blue for 1 h

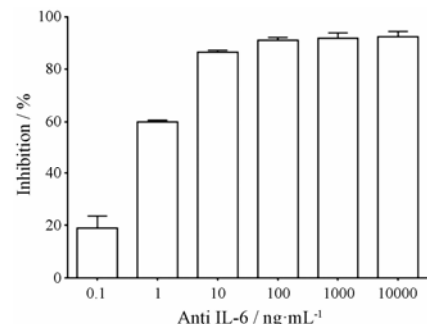


**Figure 2** Optimization of test conditions for HEK-Blue IL-6 cells. A: Cell number (IL-6 incubation for 20 h, reaction time of QUANTI-Blue for 1 h); B: IL-6 incubation time ( $5 \times 10^4$  cells/well, reaction time of QUANTI-Blue for 1 h); C: QUANTI-Blue reaction time ( $5 \times 10^4$  cells/well, IL-6 incubation for 20 h)

细胞, 并在 IL-6 存在的前提下检测了 STAT3 的激活作用。由图 3 可见, IL-6 抗体可呈浓度依赖性地抑制 STAT3 的激活,  $IC_{50}$  为  $0.91 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以上结果表明, HEK-Blue IL-6 细胞可用于 IL-6/JAK/STAT3 信号通路抑制剂的筛选。

### 2 化合物筛选

在验证细胞模型后, 本研究对 14 个天然产物进行



**Figure 3** Inhibitory activity of IL-6 antibody on STAT3 transcriptional activation

**Table 1** The inhibitory activity of nature products on STAT3 transcriptional activation

| Compound      | IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup> |              | Compound             | IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup> |              |
|---------------|--|--------------|----------------------|--|--------------|
|               | IL-6/JAK/STAT3                         | Cytotoxicity |                      | IL-6/JAK/STAT3                         | Cytotoxicity |
| Honokiol      | >10                                    | >10          | Arctigenin           | 1.28 ± 0.28                            | >10          |
| Quercetin     | >10                                    | >10          | Luteolin             | >10                                    | >10          |
| Luteoloside   | >10                                    | >10          | Cynarin              | >10                                    | >10          |
| Su chicory    | >10                                    | >10          | Curcumin             | 2.96 ± 0.84                            | >10          |
| Rosemary acid | >10                                    | >10          | Cryptotanshinone     | 6.61 ± 0.59                            | >10          |
| Hyperoside    | >10                                    | >10          | Quercetin glycosides | >10                                    | >10          |
| Echinacoside  | >10                                    | >10          | Caffeic acid         | >10                                    | >10          |

了筛选。由表 1 可见, 牛蒡子苷元、姜黄素和隐丹参酮对 STAT3 的激活均有不同程度的抑制作用, IC<sub>50</sub> 值分别为 1.28 ± 0.28、2.96 ± 0.84 和 6.61 ± 0.59 μmol·L<sup>-1</sup>, 而在最高浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 细胞未见明显的增殖抑制作用。结果表明, 牛蒡子苷元、姜黄素和隐丹参酮可抑制 IL6/JAK/STAT3 信号通路。

## 讨论

IL-6/JAK/STAT3 是细胞内调节细胞生长、存活和分化的重要信号通路, 这条信号通路也控制着 T 淋巴细胞的分化和激活。IL-6/JAK/STAT3 信号通路的异常与自身免疫性疾病和肿瘤密切相关。在自身免疫性疾病中, 这条通路的激活导致其下游调控的细胞因子的大量释放, 而在许多实体肿瘤中, STAT3 处于持续激活的状态, 导致了肿瘤细胞的不断增殖、侵袭转移, 甚至免疫逃逸<sup>[1-5]</sup>。阻断 IL-6/JAK/STAT3 信号通路也就成为治疗自身免疫性疾病和肿瘤的一个新策略。其中, IL-6 及其受体 IL-6R 单抗药物已被批准用于类风湿性关节炎、葡萄膜炎的治疗<sup>[6, 10, 11]</sup>, JAK 的小分子抑制剂也已获得上市批准, 适应症包括类风湿性关节炎和骨髓纤维化等<sup>[8, 9]</sup>。作为这条信号通路中下游最重要的转录因子 STAT3, 随着研究的不断深入和药物研发技术的提高, 也被认为是一个潜在的药物靶点。因此, 建立针对 IL-6/JAK/STAT3 信号通路的高通量筛选方法, 有助于发现结构新颖的小分子抑制剂。

本研究利用 Invivogen 公司的 HEK-Blue IL-6 细胞, 验证了该细胞模型可用于 IL-6/JAK/STAT3 信号通路抑制剂的筛选。目前, 在细胞水平针对这条信号通路筛选抑制剂最常用的方法是基于化学发光的 STAT3 报告基因方法<sup>[18]</sup>。相比于传统的化学发光报告基因方法, 该方法成本更低, 操作更简单。然而这类方法主要集中于针对阻断 IL-6/JAK/STAT3 整条信号通路的抑制剂, 尚不能定位到通路中的特定蛋白分子。因此,

为了进一步配合药物开发, 在该方法的基础上可结合针对 JAK 激酶筛选、IL-6 及其受体 IL-6R 的配体受体结合实验、STAT3 荧光偏振等方法<sup>[19]</sup>, 确定化合物作用靶点。

利用该细胞筛选模型, 本研究初步筛选了 14 个天然产物单体, 其中牛蒡子苷元、隐丹参酮和姜黄素在 10 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度下具有明显的抑制活性, 与文献报告的这些天然产物可抑制 IL-6/JAK/STAT3 信号通路是一致的<sup>[20-24]</sup>。已有文献报道和厚朴酚、斛皮素和木樨草素在肿瘤细胞上对 STAT3 磷酸化水平具有一定的抑制作用, 但有效抑制浓度大于 40 μmol·L<sup>-1</sup><sup>[25-27]</sup>, 在 HEK-Blue IL-6 细胞模型中这些化合物在 10 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度下未见明显抑制作用, 这可能与化合物浓度有关。此外, 未见文献报道木犀草苷、菊苣素、迷迭香酸、金丝桃苷、松果菊苷、洋蓟素、槲皮素苷和咖啡酸等化合物对 IL-6/JAK/STAT3 信号通路有抑制作用。由于牛蒡子苷元、隐丹参酮和姜黄素这些小分子化合物与 IL-6 抗体不同, 无法与 IL-6 蛋白直接结合, 因此仍需要结合 JAK 激酶筛选、IL-6 及其受体 IL-6R 的配体受体结合实验、STAT3 荧光偏振等方法寻找这些化合物在 IL-6/JAK/STAT3 信号通路中的直接作用蛋白分子。本课题组将应用该模型进一步筛选天然产物化合物库, 并结合其他检测方法, 寻找结构新颖的 IL-6/JAK/STAT3 信号通路抑制剂, 针对其抗肿瘤作用进行深入研究。

## References

- [1] 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.
- [2] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 41–51.
- [3] Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer [J].

- Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22: 83–89.
- [4] Ataie-Kachoei P, Pourgholami MH, Morris DL. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2013, 24: 163–173.
- [5] Chen Y, Ji M, Chen XG. Research progress of relationship between STAT3 and tumor [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1351–1358.
- [6] Thompson CA. FDA approves tocilizumab to treat rheumatoid arthritis [J]. Am J Health Syst Pharm, 2010, 67: 254.
- [7] Mascarenhas J, Hoffman R. Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18: 3008–3014.
- [8] Traynor K. FDA approves tofacitinib for rheumatoid arthritis [J]. Am J Health Syst Pharm, 2012, 69: 2120.
- [9] Raedler LA. Jakafi (Ruxolitinib): first FDA-approved medication for the treatment of patients with polycythemia vera [J]. Am Health Drug Benefits, 2015, 8: 75–79.
- [10] Pelechias E, Voulgari PV, Drosos AA. Sirukumab: a promising therapy for rheumatoid arthritis [J]. Expert Opin Biol Ther, 2017, 17: 755–763.
- [11] Scott LJ. Sarilumab: first global approval [J]. Drugs, 2017, 77: 705–712.
- [12] Kortylewski M, Yu H. STAT3 as a potential target for cancer immunotherapy [J]. J Immunother, 2007, 30: 131–139.
- [13] Klosek SK, Nakashiro K, Hara S, et al. STAT3 as a molecular target in RNA interference-based treatment of oral squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rep, 2008, 20: 873–878.
- [14] Ogura M, Uchida T, Terui Y, et al. Phase I study of OPB-51602, an oral inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3, in patients with relapsed/refractory hematological malignancies [J]. Cancer Sci, 2015, 106: 896–901.
- [15] Wong AL, Soo RA, Tan DS, et al. Phase I and biomarker study of OPB-51602, a novel signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 inhibitor, in patients with refractory solid malignancies [J]. Ann Oncol, 2015, 26: 998–1005.
- [16] Hubbard JM, Grothey A. Napabucasin: an update on the first-in-class cancer stemness inhibitor [J]. Drugs, 2017, 77: 1091–1103.
- [17] Cafferkey C, Chau I. Novel STAT 3 inhibitors for treating gastric cancer [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2016, 25: 1023–1031.
- [18] Page BD, Croucher DC, Li ZH, et al. Inhibiting aberrant signal transducer and activator of transcription protein activation with tetrapodal, small molecule Src homology 2 domain binders: promising agents against multiple myeloma [J]. J Med Chem, 2013, 56: 7190–7200.
- [19] Schust J, Berg T. A high-throughput fluorescence polarization assay for signal transducer and activator of transcription 3 [J]. Anal Biochem, 2004, 330: 114–118.
- [20] Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells [J]. J Immunol, 2003, 171: 3863–3871.
- [21] Yang JY, Zhong X, Yum HW, et al. Curcumin inhibits STAT3 signaling in the colon of dextran sulfate sodium-treated mice [J]. J Cancer Prev, 2013, 18: 186–191.
- [22] Li W, Saud SM, Young MR, et al. Cryptotanshinone, a STAT3 inhibitor, suppresses colorectal cancer proliferation and growth *in vitro* [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 406: 63–73.
- [23] Chen Z, Zhu R, Zheng J, et al. Cryptotanshinone inhibits proliferation yet induces apoptosis by suppressing STAT3 signals in renal cell carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8: 50023–50033.
- [24] Feng T, Cao W, Shen W, et al. Arctigenin inhibits STAT3 and exhibits anticancer potential in human triple-negative breast cancer therapy [J]. Oncotarget, 2017, 8: 329–344.
- [25] Michaud-Levesque J, Bousquet-Gagnon N, Beliveau R. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration [J]. Exp Cell Res, 2012, 318: 925–935.
- [26] Bi L, Yu Z, Wu J, et al. Honokiol inhibits constitutive and inducible STAT3 signaling *via* PU.1-induced SHP1 expression in acute myeloid leukemia cells [J]. Tohoku J Exp Med, 2015, 237: 163–172.
- [27] Huang X, Dai S, Dai J, et al. Luteolin decreases invasiveness, deactivates STAT3 signaling, and reverses interleukin-6 induced epithelial-mesenchymal transition and matrix metalloproteinase secretion of pancreatic cancer cells [J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 2989–3001.