

## 新型STAT3小分子抑制剂LZJ541抑制肝癌细胞增殖的活性研究

刘羿晨, 季 鸣, 杜婷婷, 刘文强, 李 莉, 陈晓光\*

(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, 活性物质发现与适药化北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 信号传导与转录激活因子3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是细胞增殖转移的重要调节因子, 参与多种恶性肿瘤的发生和发展, 是目前靶向抗肿瘤药物研究的热点之一。本课题组通过两面神激酶 (Janus kinase, JAK)/STAT3 通路抑制剂筛选模型筛选得到了新型苯并咪唑结构小分子化合物LZJ541, 具有明确的STAT3抑制活性。通过MTT实验检测LZJ541对肝癌HepG2及前列腺癌PC-3细胞增殖能力的影响; 通过Western blot实验检测其对肿瘤细胞中STAT3通路相关蛋白的影响; 通过流式细胞术检测其对HepG2细胞凋亡水平及周期分布的影响。结果表明, LZJ541显著抑制STAT3信号通路的活化, 能显著抑制HepG2细胞增殖, 其半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) 为  $13.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 远低于STAT3低表达的PC-3细胞 ( $IC_{50}$ :  $41.99 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), LZJ541还可抑制HepG2细胞中STAT3蛋白的磷酸化, 从而诱导细胞凋亡和周期阻滞, 发挥抗肿瘤作用。综上, LZJ541具有一定的体外抗肿瘤作用, 本研究为围绕这一化合物研发新型STAT3靶向抗肿瘤药物提供了实验依据。

**关键词:** 苯并咪唑; IL6/JAK/STAT3 信号通路; STAT3 抑制剂; 肝细胞癌; 抗肿瘤药物

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)05-1396-06

## Inhibitory effect of LZJ541, a novel small molecule inhibitor of STAT3, on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells

LIU Yi-chen, JI Ming, DU Ting-ting, LIU Wen-qiang, LI Li, CHEN Xiao-guang\*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of Non-Clinical Drug Metabolism and PK/PD, Beijing Key Laboratory of Active Substances Discovery and Druggability Evaluation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is an important regulatory factor of cell proliferation and metastasis, involved in the occurrence and development of a variety of malignant tumors, and it is one of the hot spots in the research of targeted anti-tumor drugs. Our group screened a novel benzobis (imidazole) structure small molecule compound LZJ541 through the screening model of Janus kinase (JAK)/STAT3 pathway inhibitors, which has definite STAT3 inhibitory activity. We examined the effect of LZJ541 on the proliferation of HepG2 and PC-3 cells by MTT assay *in vitro*, detected the effect of LZJ541 on the expression of STAT3-related proteins in HepG2 cells by Western blot, and measured the effect of LZJ541 on the apoptosis and cell cycle arrest of HepG2 cells *via* flow cytometry. The results indicated that LZJ541 significantly inhibited the activation of STAT3 signaling pathway and restrained the proliferation of HepG2 cells. Its half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was  $13.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , which was much lower than that of PC-3 cells (with low STAT3 expression,  $IC_{50}$ :  $41.99 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), LZJ541 can also inhibit the phosphorylation of STAT3 in HepG2 cells, thereby inducing apoptosis and cycle arrest and then exerting anti-tumor effects. In conclusion, LZJ541 has a certain anti-tumor effect *in vitro*,

收稿日期: 2022-03-02; 修回日期: 2022-03-24.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-1-I2M-026).

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0274

which provides an experimental basis for the development of new STAT3-targeted anti-tumor drugs around this kind of compounds.

**Key words:** benzobis(imidazole); IL6/JAK/STAT3 signaling pathway; STAT3 inhibitor; hepatocellular carcinoma; antineoplastic agent

信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是一种胞质转录因子, 参与了细胞中大量生长因子或细胞因子的应答, 是细胞生长、分化及凋亡等生理过程的重要调节因子<sup>[1]</sup>。STAT3 的过度激活与多种人类恶性肿瘤的发生发展存在密切关系, 其在头颈部鳞癌、食管癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、肺癌及急性髓系白血病等恶性癌症中呈现高激活状态<sup>[2]</sup>。在多种癌症中, STAT3 活化水平与疾病进展和不良预后相关<sup>[3]</sup>。

随着研究的深入, STAT3 在肿瘤发生发展中的重要地位也逐渐被熟知, 靶向两面神激酶 (Janus kinase, JAK)/STAT3 信号通路成为抗肿瘤药物研发的焦点之一。目前除美国波士顿生物医学公司研发的 BBI608 (Napabucasin) 于 2016 年获得美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准上市应用于胰腺癌治疗外, 相关小分子抑制剂及天然产物来源抑制剂均处于临床前及临床研究阶段<sup>[4]</sup>。本研究从一系列苯并咪唑结构化合物中筛选得到了一个全新的化合物 LZJ541, 这类具有三环或多环的平面芳香族化合物通常带有荧光, 被认为是分子探针的有效材料<sup>[5]</sup>, 其药理活性往往被忽视。本研究发现 LZJ541 具有明确的 JAK/STAT3 信号通路抑制活性, 可显著抑制肝癌 HepG2 细胞增殖,  $IC_{50}$  远小于 STAT3 表达水平较低的 PC-3 细胞, 并且能通过抑制 HepG2 细胞内 STAT3 的磷酸化, 促进其凋亡和周期阻滞, 有望成为新型 STAT3 靶向抗肿瘤抑制剂。

## 材料与方法

**细胞与试剂** 人肝细胞癌细胞 HepG2、人前列腺癌细胞 PC-3 (中国医学科学院基础医学研究所细胞中心, 由本实验室传代并保种); HEK-BLUE™-IL6 细胞 (法国 InvivoGen 公司); 隐丹参酮 (cryptotanshinone, CTS, 1149-99-1, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 高效 RIPA 裂解液 (北京索莱宝科技有限公司); MTT (美国 Sigma-Aldrich 公司); 抗 JAK2、p-JAK2、STAT1、p-STAT1 Y701、STAT3、p-STAT3 Y705、STAT5、p-STAT5 Y694 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司);  $\beta$ -actin 抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); 细胞

凋亡/周期试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司); LZJ541 (本所李莉课题组提供, HPLC 测定纯度  $\geq 98\%$ )。

**细胞培养** PC-3 细胞培养于含 10% 胎牛血清 (FBS) 及  $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$  青霉素、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素的 1640 培养基, HepG2、HEK-BLUE™-IL6 细胞培养于含 10% FBS 及  $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$  青霉素、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素的 DMEM 培养基。

**仪器** Biotek Synergy HIM 全波长酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); BD FACS Verse 流式细胞仪 (美国 BD 医疗器械有限公司); Caliper LabChip 2000 Drug Discovery System (美国 Caliper 公司)。

**STAT3 抑制剂筛选** 利用本实验室建立的 JAK/STAT3 通路抑制剂筛选方法进行检测<sup>[6]</sup>。将 HEK-BLUE™-IL6 细胞接种于无菌 96 孔板 (每孔细胞数  $5 \times 10^4$  个), 每孔加入终浓度为  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的白细胞介素 6 (interleukin 6, IL6) 及不同浓度的阳性对照药 CTS 或 LZJ541, 终体积为  $200 \mu\text{L}$ 。在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度条件下继续培养 20 h, 然后从每个待测孔中吸取  $20 \mu\text{L}$  上清至另一 96 孔板, 每孔加入 QUANTI-Blue 显色液  $180 \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1 h, 于  $655 \text{ nm}$  波长下检测吸光度 (A) 值, 计算  $IC_{50}$ 。

**激酶抑制活性检测**<sup>[7]</sup> 通过 microfluidic mobility shift assay 采用 Caliper LabChip 2000 Drug Discovery System 检测 LZJ541 对 JAK1、JAK2、JAK3、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、肉瘤基因 (sarcoma gene, SRC) 激酶的抑制活性, 该实验委托上海睿智生物有限公司完成。将终浓度  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 LZJ541 与激酶加入 384 孔板, 孵育 10 min 后加入 FAM 标记的多肽溶液, 孵育后加入终止缓冲液, 计算抑制率。

**MTT 检测** 将对数生长期的 PC-3 及 HepG2 细胞消化后, 接种于 96 孔板, 每孔细胞数为 3 000 个, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的 LZJ541 ( $0$ 、 $1.5625$ 、 $3.125$ 、 $6.25$ 、 $12.5$ 、 $25$ 、 $50$ 、 $100$  和  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 及相应溶剂 (DMSO 终浓度  $< 0.2\%$ ) 对照的新鲜培养基, 使每孔溶液体积为  $200 \mu\text{L}$ , 每组设 3 个平行孔,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下继续培养 72 h, 每孔加入  $20 \mu\text{L}$  新鲜配制的含  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  MTT 的无血清培养基,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下孵育 3 h, 待蓝紫色沉淀出现后小心弃去上清, 每孔加入  $150 \mu\text{L}$  DMSO,

充分震荡后检测A值,计算 $IC_{50}$ 。

**蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测** 将HepG2细胞用不同浓度(0.5、10、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) LZJ541处理16 h,用RIPA裂解细胞,蛋白定量后进行电泳,然后将蛋白电转至PVDF膜,相应一抗4 °C孵育过夜,对应种属二抗孵育后进行ECL (efficient chemiluminescence) 化学发光检测。

**流式细胞术检测细胞凋亡**<sup>[8]</sup> 不同浓度LZJ541(0.5、10、20、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理细胞48 h后,消化细胞,加入PI (propidium iodide) 和Annexin-V进行染色,流式细胞仪检测细胞凋亡比例。

**流式细胞术检测细胞周期**<sup>[9]</sup> 收集不同浓度LZJ541(0.5、10、20、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理24 h后的细胞,75%乙醇固定,-20 °C过夜。将固定的细胞水化后,加入DNA Staining Solution避光孵育30 min,流式上机检测。

**数据处理** 实验重复3次,数据以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用GraphPad Prism 8.0.2软件进行数据统计和计算。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

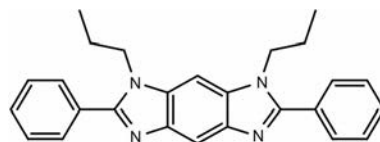
## 结果

### 1 IL6/JAK/STAT3信号通路抑制活性筛选

LZJ541是具有新型结构的苯并咪唑类小分子化合物,分子式为 $C_{26}H_{26}N_4$ ,结构如图1所示。将终浓度为0.08、0.4、2、10和50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的LZJ541或CTS加入HEK-BLUE™-IL6细胞,CTS为已知的STAT3抑制剂<sup>[10]</sup>,作为阳性对照,检测LZJ541对IL6/JAK/STAT3通路的抑制情况。结果显示(图2A),LZJ541与CTS均能明显抑制IL6/JAK/STAT3信号通路激活,其中LZJ541的 $IC_{50}$ 为 $7.21 \pm 4.88 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,CTS为 $6.15 \pm 1.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 2 LZJ541对HepG2细胞增殖的影响

本实验室前期研究表明,PC-3细胞中STAT3蛋白表达远低于HepG2细胞<sup>[11]</sup>,LZJ541作用72 h后,能



**Figure 1** Chemical structure of LZJ541. Chemical formula:  $C_{26}H_{26}N_4$ , molecular weight: 394.522 0

剂量依赖地抑制HepG2细胞增殖,其 $IC_{50}$ 为 $13.8 \pm 1.85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图2B),远低于PC-3细胞的 $IC_{50}$ ( $41.99 \pm 2.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),进一步说明LZJ541能通过抑制STAT3信号通路抑制细胞增殖,其抑制作用与STAT3的表达水平相关。

### 3 LZJ541对STAT3信号通路相关激酶的影响

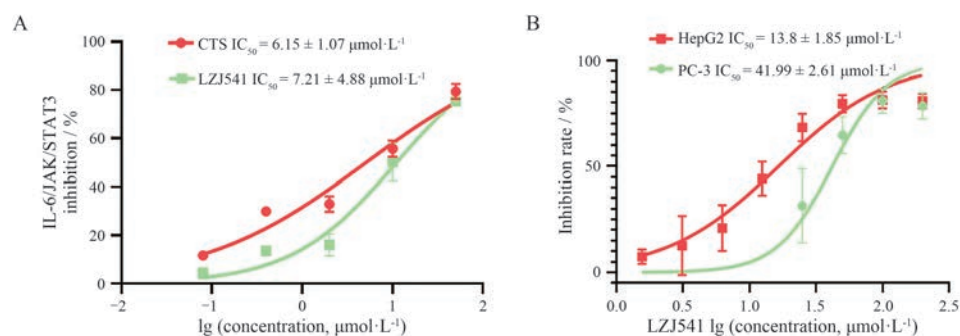
JAK1、JAK2、JAK3、EGFR、SRC是STAT3上游激酶,均可催化STAT3的磷酸化激活。为了探究LZJ541对IL6/JAK/STAT3信号通路抑制的机制,进一步检测了LZJ541对JAK1、JAK2、JAK3、EGFR、SRC激酶的抑制情况,结果如表1所示。LZJ541对这些激酶没有明显抑制, $IC_{50}$ 均大于10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,推测LZJ541的JAK/STAT3通路抑制活性是由于靶向STAT3而导致。

**Table 1** Kinase inhibitory activity of LZJ541 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). EGFR: Epidermal growth factor receptor; SRC: Sarcoma gene

Kinase	Inhibition/%
JAK1	27.6 $\pm$ 5.2
JAK2	-4.4 $\pm$ 1.4
JAK3	-3.9 $\pm$ 1.1
EGFR	4.9 $\pm$ 1.6
SRC	18.1 $\pm$ 6.5

### 4 LZJ541对HepG2细胞STAT3通路相关蛋白的影响

STAT3蛋白酪氨酸705位磷酸化(Y705)是其活化形式,STAT3磷酸化后形成二聚体并进入细胞核,进一步激活下游靶基因,从而驱动肿瘤细胞增殖与凋亡抵抗<sup>[12]</sup>。为了验证LZJ541的JAK/STAT3通路抑制活



**Figure 2** LZJ541 significantly inhibited the activity of Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway and inhibited the proliferation of HepG2 and PC-3 cells. A: Interleukin 6 (IL6)/JAK/STAT3 signaling pathway inhibitory activities of cryptotanshinone (CTS) and LZJ541; B: The inhibitory activity of LZJ541 in HepG2 and PC-3 cells

性是否由于靶向 STAT3 激活所导致, 通过 Western blot 实验检测了不同浓度 (0、5、10、20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) LZJ541 处理后 HepG2 细胞中 STAT3、p-STAT3 Y705 及上游激酶 JAK2、p-JAK2 蛋白的表达。结果如图 3A、B 所示, LZJ541 能剂量依赖地抑制 p-STAT3 Y705 蛋白的表达, 而对 STAT3 总蛋白表达无明显影响, 对上游 JAK2 激酶及其磷酸化也未见明显抑制。STAT1 与 STAT5 具有与 STAT3 类似的 SH2 结构域, 同样是通过磷酸化形成二聚体的方式诱导下游靶基因的表达, 本研究通过 Western blot 实验检测了 LZJ541 对 HepG2 细胞 STAT1 与 STAT5 磷酸化的影响, 结果如图 3C、D 所示, LZJ541 对 STAT1 及 STAT5 的磷酸化影响不明显, 同时也不会影响 STAT1 与 STAT5 的表达。以上结果提示, LZJ541 可能通过抑制 STAT3 Y705 位磷酸化而阻断 JAK/STAT3 通路的活化, 并对 STAT1 与 STAT5 没有明显影响。

### 5 LZJ541 对 HepG2 细胞凋亡的影响

为了进一步探究 LZJ541 的体外抗 HepG2 机制, 通过流式细胞仪检测 LZJ541 对 HepG2 细胞凋亡水平的影响。结果如图 4 所示, 以不同浓度 LZJ541 (0、5、10、20、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理 HepG2 细胞 48 h 后, LZJ541 能浓度依赖地促进 HepG2 细胞凋亡, 凋亡率分别为 (1.68  $\pm$  1.34) %、(2.17  $\pm$  1.03) % ( $P = 0.64$ )、(6.63  $\pm$  2.76) % ( $P = 0.04$ )、(13.90  $\pm$  4.25) % ( $P = 0.009$ )、(29.13  $\pm$  9.67) % ( $P = 0.008$ ), 差异具有统计学意义。

### 6 LZJ541 对 HepG2 细胞周期分布的影响

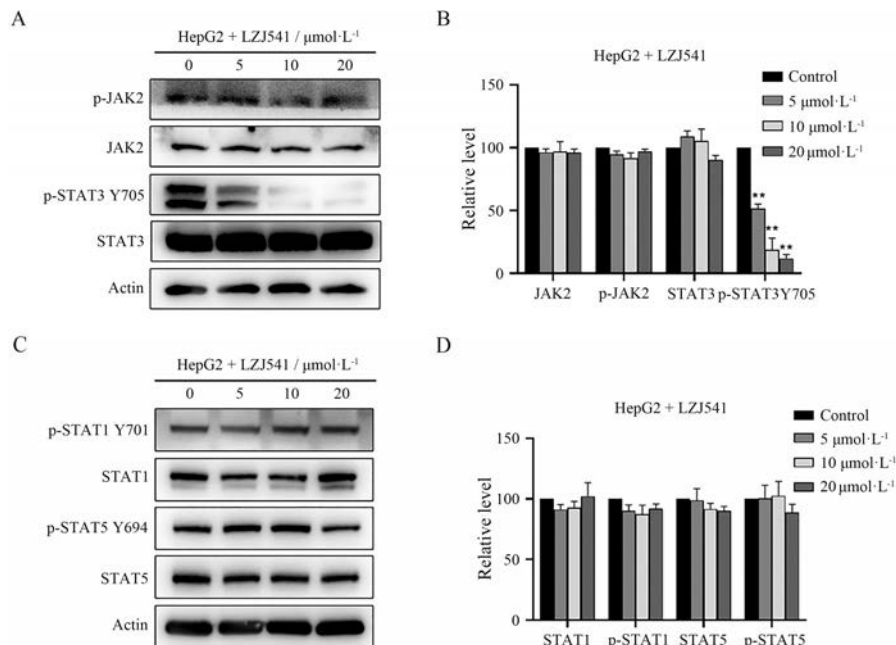
在不同浓度 LZJ541 (0、5、10、20、40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理 HepG2 细胞 24 h 后, 进一步通过流式细胞仪检测 LZJ541 对 HepG2 细胞周期分布的影响。结果如图 5 所示, LZJ541 处理 24 h 后, HepG2 细胞 G1 期分布百分比分别增加到 (67.1  $\pm$  1.15) %、(71.0  $\pm$  1.2) %、(73.7  $\pm$  1.6) %、(76.24  $\pm$  1.6) %, 说明 LZJ541 可诱导 HepG2 细胞 G1 期阻滞。

综上, LZJ541 能通过抑制 HepG2 细胞 STAT3 磷酸化激活, 诱导细胞凋亡和 G1 期阻滞, 从而抑制 HepG2 细胞的体外增殖。

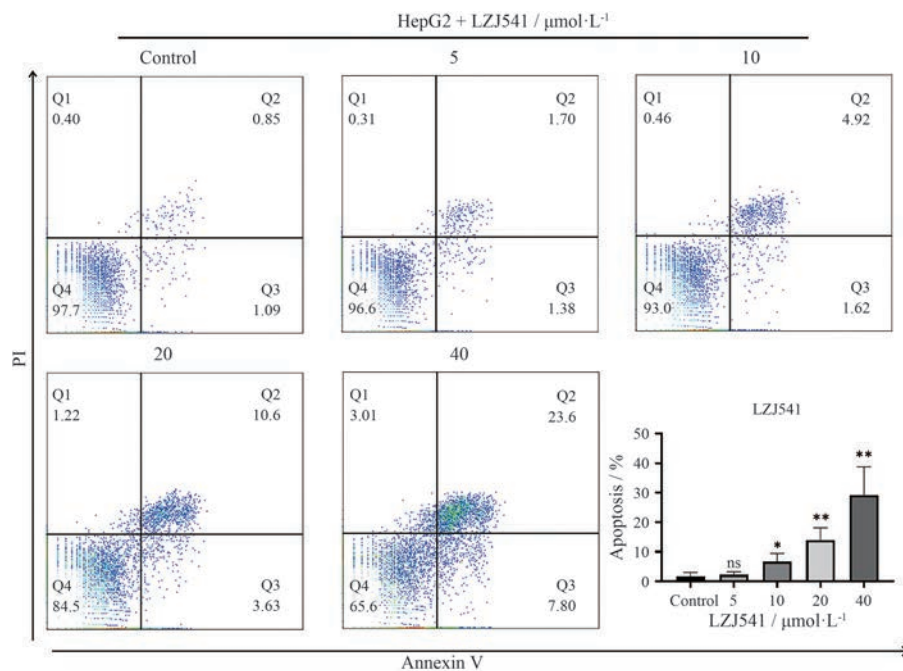
### 讨论

2020 年我国新增肝癌病例超过 41 万例, 死亡人数超过 39 万<sup>[13]</sup>, 肝癌因其高发病率与极差的预后成为国人健康面临的一大威胁。近年来肝癌靶向治疗取得了一定进展, 索拉菲尼和乐伐替尼是目前非手术治疗的一线用药<sup>[14]</sup>, 然而靶向药物对晚期肝癌患者总生存期的延长十分有限<sup>[15]</sup>, 因此进一步研究肝癌发病机制, 发现新的抗肝癌药物具有重要意义。

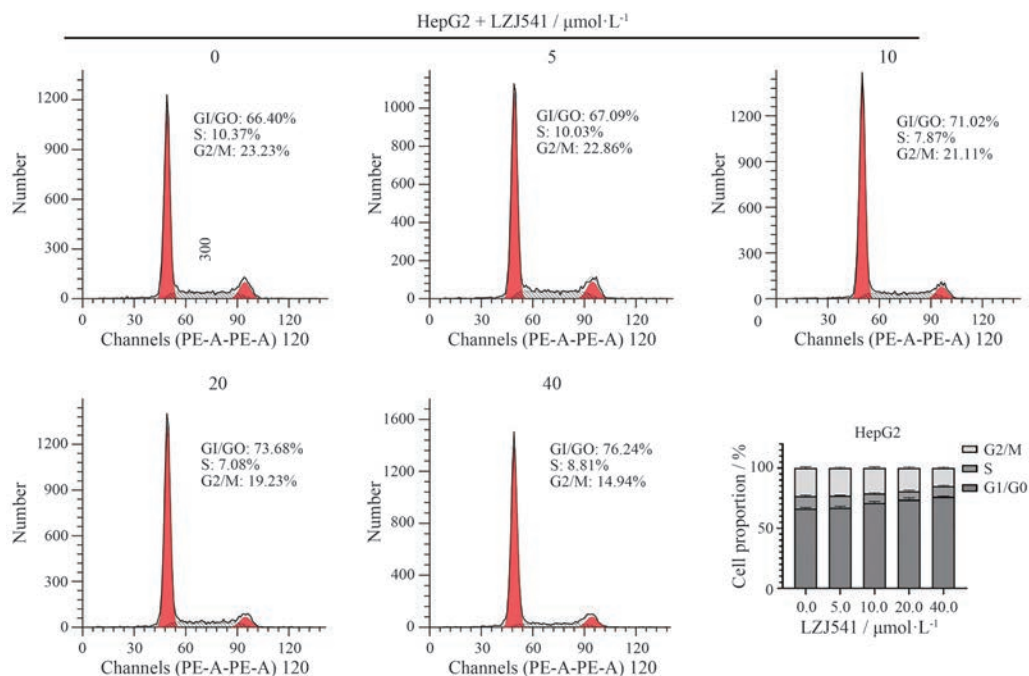
STAT3 在多种恶性肿瘤中异常激活, 促进肿瘤细胞增殖, 抑制凋亡<sup>[3]</sup>, 针对 STAT3 抑制剂的开发已历时 20 余年, 目前有多种 STAT3 抑制剂正处于临床研究阶段, 其中美国波士顿生物医学公司研发的 BBI608 是目



**Figure 3** LZJ541 significantly inhibited the expression of p-STAT3 Y705 in HepG2 cells. A: The levels of JAK2/STAT3 signaling pathway related proteins were detected *via* Western blot in HepG2 cells exposure to various concentrations of LZJ541 for 24 h; B: Histogram of the relative expression level of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 Y705; C: The levels of STAT1, p-STAT1 Y701, STAT5, p-STAT5 Y694 were detected by Western blot in HepG2 cells exposure to LZJ541; D: Histogram of the relative expression level of STAT1, p-STAT1 Y701, STAT5, p-STAT5 Y694. \*\* $P < 0.01$  vs control group



**Figure 4** Flow cytometric analysis of the apoptotic effect of LZJ541 in HepG2 cells through Annexin-V-FITC/PI staining assay. LZJ541 promoted apoptosis of HepG2 cells in a concentration-dependent manner and the histograms for apoptosis rate.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group. ns: Not significant



**Figure 5** Cell cycle analysis of LZJ541 by flow cytometry. HepG2 cells were treated with increasing concentrations of LZJ541 for 24 h. LZJ541 induced G1 phase arrest of HepG2 in a dose-dependent manner.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$

前唯一一个被 FDA 批准应用于临床的 STAT3 抑制剂<sup>[4]</sup>, 而其他抑制剂如日本大冢制药公司 STAT3 抑制剂 OPB-31121 则由于其活性与外周神经系统毒性等原因终止于临床 I 期试验<sup>[16]</sup>, 可见提高 STAT3 抑制剂的靶向性与活性, 降低不良反应, 仍是现阶段 STAT3 抑制

剂研发面临的重要挑战。现有研究证实, JAK/STAT3 信号通路与肝癌的发生发展密切相关<sup>[17,18]</sup>, 然而目前还未有 STAT3 靶向药物应用于肝癌的治疗。在本研究中, 小分子化合物 LZJ541 具有明确的 STAT3 靶点活性, 能通过抑制肝癌 HepG2 细胞中 STAT3 蛋白的磷酸化,

诱导细胞凋亡和 G1 期阻滞, 从而显著抑制 HepG2 细胞增殖 ( $IC_{50}$ :  $13.8 \pm 1.85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 具有明确的体外抗肝癌活性。

LZJ541 具有苯并咪唑结构, 这类结构在既往研究中被认为是分子探针的优势前体, 本研究率先发现了其 STAT3 抑制活性, 提示在新型药物的开发中也应关注某些功能结构, 其药理活性不应被忽视。在后续研究中, 会对 LZJ541 进行进一步结构优化与筛选, 提升其靶点活性及抗肿瘤活性, 并通过建立异位移植瘤模型对其及其衍生物的体内抗肿瘤活性加以探索, 进一步探究其抗肝癌机制。

综上, 本研究发现苯并咪唑结构化合物 LZJ541 具有抑制 IL6/JAK/STAT3 信号通路的作用, 并首次验证了其抗肝癌细胞体外增殖活性, 为开发新型 STAT3 小分子抑制剂及通过抑制 STAT3 信号通路治疗肝癌提供实验基础。

**作者贡献:** 刘羿晨负责主要实验操作、部分实验设计和部分论文撰写; 季鸣和杜婷婷参与实验操作和论文修改; 刘文强和李莉负责化合物合成及结构改造; 陈晓光负责实验设计、论文撰写及修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Banerjee K, Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: a review [J]. *Int J Cancer*, 2016, 138: 2570-2578.
- [2] Ji Y, Liu Y, Xue N, et al. Cryptotanshinone inhibits esophageal squamous-cell carcinoma *in vitro* and *in vivo* through the suppression of STAT3 activation [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 883-896.
- [3] Lee H, Jeong AJ, Ye SK. Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy [J]. *BMB Rep*, 2019, 52: 415-423.
- [4] Yee NS. Update in systemic and targeted therapies in gastrointestinal oncology [J]. *Biomedicines*, 2018, 6: 34.
- [5] Boydston AJ, Vu PD, Dykhno OL, et al. Modular fluorescent benzobis(imidazolium) salts: syntheses, photophysical analyses, and applications [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 3143-3156.
- [6] Ji M, Xue N, Huang R, et al. Validation and application a cell-based screening model for IL-6/JAK/STAT3 inhibitor [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 749-753.
- [7] Xu L, Lao Y, Zhao Y, et al. Screening active compounds from garcinia species native to China reveals novel compounds targeting the STAT/JAK signaling pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 910453.
- [8] Jin Y, Chen X, Gao Z, et al. Bisdemethoxycurcumin alleviates vandetanib-induced cutaneous toxicity *in vivo* and *in vitro* through autophagy activation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 144: 112297.
- [9] Zheng X, Xu K, Zhu L, et al. MiR-486-5p act as a biomarker in endometrial carcinoma: promotes cell proliferation, migration, invasion by targeting MARK1 [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 4843-4853.
- [10] Zhang Y, Lu W, Zhang X, et al. Cryptotanshinone protects against pulmonary fibrosis through inhibiting Smad and STAT3 signaling pathways [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 147: 104307.
- [11] Chen Y, Ji M, Zhang S, et al. Bt354 as a new STAT3 signaling pathway inhibitor against triple negative breast cancer [J]. *J Drug Target*, 2018, 26: 920-930.
- [12] Kao JT, Feng CL, Yu CJ, et al. IL-6, through p-STAT3 rather than p-STAT1, activates hepatocarcinogenesis and affects survival of hepatocellular carcinoma patients: a cohort study [J]. *BMC Gastroenterol*, 2015, 15: 50.
- [13] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134: 783-791.
- [14] Ko KL, Mak LY, Cheung KS, et al. Hepatocellular carcinoma: recent advances and emerging medical therapies [J]. *F1000Res*, 2020, 9: F1000Faculty Rev-620.
- [15] Kudo M, Finn RS, Qin S, et al. Lenvatinib *versus* sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial [J]. *Lancet*, 2018, 391: 1163-1173.
- [16] Okusaka T, Ueno H, Ikeda M, et al. Phase 1 and pharmacological trial of OPB-31121, a signal transducer and activator of transcription-3 inhibitor, in patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatol Res*, 2015, 45: 1283-1291.
- [17] Wan S, Zhao E, Kryczek I, et al. Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal *via* STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147: 1393-1404.
- [18] Liu Y, Luo YH, Li SM, et al. 2-(Naphthalene-2-thio)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone induces apoptosis *via* ROS-mediated MAPK, AKT, and STAT3 signaling pathways in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022, 45: 33-43.