

积雪草酸调控JAK2/STAT3信号通路对前列腺癌细胞凋亡的影响

刘 嘉¹, 严宝飞¹, 许晨新¹, 曾庆琪^{1, 2*}

1. 江苏卫生健康职业学院, 江苏 南京 211800

2. 南京中医药大学第一附属医院, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 研究积雪草酸(AA)对前列腺癌PC-3细胞作用及分子机制。方法 采用CCK8法检测积雪草酸(5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对PC-3细胞活力的影响;采用Hoechst法和Annexin V/PI法检测积雪草酸(20、30、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对PC-3细胞凋亡的影响;采用JC-1法检测积雪草酸对PC-3细胞线粒体膜电位的影响;采用Western blotting法检测积雪草酸对PC-3细胞线粒体凋亡途径和Janus激酶2(JAK2)/信号转导与转录活化因子3(STAT3)信号通路相关蛋白表达水平的影响。采用Annexin V/PI法、JC-1法、Western blotting法检测JAK2激动剂coumestrol A1(C-A1)对积雪草酸诱导PC-3细胞线粒体凋亡及相关蛋白表达的影响。结果 与对照组比较,积雪草酸可浓度及时间相关性地抑制PC-3细胞增殖,20~160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组差异显著($P<0.01$),作用24、48、72 h后的半数抑制浓度(IC_{50})值分别为29.98、23.04、13.81 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;20、30、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 积雪草酸显著促进PC-3细胞凋亡($P<0.05, 0.01$);可明显导致PC-3细胞线粒体膜电位下降;显著上调PC-3细胞线粒体凋亡相关Bax、cleaved Caspase-3的蛋白表达($P<0.05, 0.01$),显著下调Bcl-2的蛋白表达($P<0.05, 0.01$),显著抑制JAK2/STAT3信号通路JAK2和STAT3的磷酸化水平($P<0.05, 0.01$)。与积雪草酸组比较,积雪草酸+C-A1显著抑制PC-3细胞的凋亡水平($P<0.01$),明显抑制PC-3细胞线粒体膜电位下降,显著下调Bax、cleaved Caspase-3蛋白表达($P<0.01$),显著上调Bcl-2蛋白表达($P<0.01$),显著提升JAK2和STAT3的磷酸化水平($P<0.01$)。结论 积雪草酸可通过抑制JAK2/STAT3信号通路诱导前列腺癌细胞发生线粒体凋亡,进而发挥抗前列腺癌作用。

关键词: 前列腺癌; 积雪草酸; JAK2/STAT3信号通路; 细胞凋亡; 线粒体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)01-0085-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.01.012

Effect of asiatic acid on apoptosis of prostate cancer cells via regulation of JAK2/STAT3 signaling pathway

LIU Jia¹, YAN Baofei¹, XU Chenxin¹, ZENG Qingqi^{1, 2}

1. Jiangsu Health Vocational College, Nanjing 211800, China

2. The First Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To study the effects and molecular mechanism of asiatic acid (AA) on prostate cancer PC-3 cells. **Method** CCK8 assay was used to detect the effect of AA (5, 10, 20, 40, 80, and 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on PC-3 cell proliferation. Hoechst assay and Annexin V/PI assay were used to detect the effect of AA (20, 30, and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on PC-3 cell apoptosis. JC-1 method was used to detect the effect of AA on mitochondrial membrane potential of PC-3 cells. Western blotting was used to detect the effect of AA on the expression level of mitochondrial apoptosis pathway and JAK2/STAT3 signaling pathway related proteins in PC-3 cells. Annexin V/PI method, JC-1 method and Western blotting method were used to detect the effects of JAK2 agonist Coumestrol A1 (C-A1) on mitochondrial apoptosis and expression of related proteins in PC-3 cells induced by AA. **Results** Compared with control group, AA significantly inhibited the proliferation of PC-3 cells in a concentration-dependent and time-dependent manner, the difference of 20—160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group was significant ($P<0.01$), and the IC_{50} value was 29.98, 23.04 and 13.81 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ after 24, 48 and 72 h. AA significantly induced the apoptosis of PC-3 cells compared with control group ($P<0.05$ and 0.01). AA also changed the MMP in PC-3 cells. AA significantly up-regulated mitochondrial apoptosis-related Bax and cleaved Caspase 3 expression compared with

收稿日期: 2022-08-11

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20191498); 国家中医药管理局名医验方评价与转化重点实验室开放课题(NZYJDMF-2020001); 江苏省卫生健康委医学科研项目重点项目(ZDB2020020)

第一作者: 刘 嘉,男,硕士,副教授,研究方向为中药资源化学。E-mail: liujia402@163.com

*通信作者: 曾庆琪,男,博士,教授,研究方向为中医药防治肿瘤。E-mail: zengqq111@126.com

control group ($P < 0.05$ and 0.01), and significantly down-regulated mitochondrial apoptosis-related Bcl-2 expression ($P < 0.05$ and 0.01). The phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 in JAK2/STAT3 signaling pathway were also significantly inhibited by AA ($P < 0.05$ and 0.01) compared with control group. Compared with AA group, AA+C-A1 significantly inhibited the apoptosis of PC-3 cells ($P < 0.01$), inhibited the MMP in PC-3 cells significantly, significantly down-regulated Bax and cleaved Caspase 3 expression in PC-3 cells ($P < 0.01$), and significantly up-regulated Bcl-2 expression ($P < 0.01$), as well as significantly increased the phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 ($P < 0.01$). **Conclusion** AA could induce mitochondrial apoptosis in prostate cancer cells by inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway, and finally play an anti-prostate cancer role.

Key words: prostate cancer; asiatic acid; JAK2/STAT3 signaling pathway; apoptosis; mitochondria

前列腺癌是一种常见的癌症,威胁男性的生命质量及生活品质^[1]。据相关统计表明,前列腺癌在癌症新发病例中排名第一,在男性癌症相关死亡中排名第二^[2]。前列腺癌患病率与年龄呈正相关性,并且随着地区的不同而有显著差异,欧洲和美洲的患病率高于亚洲^[3]。近年来,包括中国在内的亚洲国家前列腺癌患者的死亡率和发病率不断上升,但仍低于西方国家^[4]。前列腺癌发病可能与多种因素有关,包括年龄、家族史、遗传和性激素水平等^[5]。目前,前列腺癌患者可通过化疗、激素药物和手术等方法治疗,但其转移性和激素抵抗性风险仍然较高^[6]。因此,寻找预防和治疗前列腺癌的新药迫在眉睫。

中医药发挥抗肿瘤作用具有疗效确切和安全性高等特点,复杂的化学成分正是其发挥作用的基础。因此,中药中丰富的化学成分是开发抗肿瘤药物的宝贵资源。积雪草酸是一种具有广泛生物活性的五环三萜类化合物,为积雪草、委陵菜等诸多传统中药有效成分之一^[7]。抗肿瘤作用为积雪草酸诸多显著作用之一,其可通过多种途径,作用于多种靶点,发挥对肺癌、乳腺癌和卵巢癌等恶性肿瘤的作用,但当前鲜有关于其抗前列腺癌作用及机制的报道^[8-10]。前期研究显示,积雪草酸可逆转转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)诱导的前列腺癌的上皮间质转化进程,进而抑制前列腺癌细胞侵袭和转移的作用^[7]。本研究首次以前列腺癌细胞PC-3为对象,研究积雪草酸对PC-3细胞凋亡的影响,并基于Janus激酶2(JAK2)/信号转导与转录活化因子3(STAT3)信号通路初步探讨其诱导凋亡的作用机制,以期积雪草酸抗前列腺癌临床应用提供参考。

1 材料

1.1 细胞株

人前列腺癌PC-3细胞株购自ATCC,采用含10% FBS的DMEM培养,并置于5% CO₂、37℃条件下的恒温细胞培养箱中培养。

1.2 药物及主要试剂

积雪草酸(批号JXCS20200603,质量分数 $\geq$

98%),购自南京秋实生物科技有限公司;JAK2激动剂 coumermycin A1 (C-A1,批号GR317,质量分数 $\geq 98\%$),购自美国BOC Sciences公司;二甲基亚砜(DMSO,批号V900090)、DMEM培养基(批号D6429)、AnnexinV-FITC/PI双染试剂盒(批号APOAF),均购自德国Sigma-aldrich公司;CCK8试剂盒(批号CA1210),购自Solarbio公司;JC-1检测试剂盒(批号BL711A),购自Biosharp公司;胎牛血清(批号10099141C)、PVDF膜(批号LC2002)、BCA蛋白定量试剂盒(批号23246),均购自美国Thermo公司。一抗:Bcl-2(批号15071T)、Bax(批号5023T)、cleaved Caspase-3(批号9661T)、JAK2(批号3230T)、p-JAK2(批号4406T)、STAT3(批号12640S)、p-STAT3(批号49081S)、GAPDH(批号5174T)和二抗IgG-HRP(批号32935S),均购自美国CST公司。

1.3 主要仪器

CO₂培养箱,德国IRM公司;E2-20TJ型水系统,南京EPED有限公司;TS100、TS2R型显微镜,日本尼康公司;Calibur型流式细胞仪,美国BD公司;MK3型酶标仪,美国Thermo公司;MINI-4小型垂直电泳仪,美国伯乐公司。

2 方法

2.1 CCK8法检测细胞存活率

收集对数生长期的PC-3细胞接种于96孔板中(每孔100 μ L、 5×10^3 个),培养24 h后弃去培养基,分别加入含0.1% DMSO(对照组)或浓度为5、10、20、40、80、160 μ mol·L⁻¹积雪草酸的DMEM培养基(100 μ L),每组3个复孔,给药24、48、72 h后,弃去培养基,加入CCK8工作液,孵育2 h,450 nm处测定吸光度(A)值,计算细胞相对存活率^[11]。

$$\text{细胞相对存活率} = A_{\text{积雪草酸}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 细胞凋亡检测

2.2.1 Hoechst法检测细胞凋亡 收集对数生长期的PC-3细胞接种于24孔板中(每孔500 μ L、 2.5×10^4 个),培养24 h后,分为对照组(含0.1% DMSO培养基)、积雪草酸(20、30、40 μ mol·L⁻¹)组。给药24 h

后弃上清液, PBS洗涤3次, 显微镜下观察细胞形态并拍照。加入300 μL Hoechst染液, 避光孵育10 min后PBS洗涤2次, 随后加入300 μL PBS, 荧光倒置显微镜观察并拍照。

2.2.2 Annexin V/PI法检测细胞凋亡率 收集对数生长期的PC-3细胞接种于6孔板中(每孔2 mL, 4×10^5 个), 培养24 h后, 细胞分组给药同“2.2.1”项。24 h后1 000 rmin^{-1} 离心10 min, 收集各组细胞PBS洗涤2次, 并用500 μL 缓冲液重悬, 依次加入2种染液并混匀, 室温避光孵育15 min, 最后流式细胞术检测细胞凋亡水平。

2.3 JC-1法检测线粒体膜电位变化

细胞培养及接种同“2.1”项, 细胞分组给药同“2.2.1”项。24 h后用PBS洗涤2次, 随后每孔加入40 μL 无血清培养基和40 μL 工作液并混匀, 避光孵育20 min, 弃液后依次加入缓冲液和细胞培养液, 倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.4 Western blotting法检测相关蛋白表达

细胞培养及接种同“2.2.2”项, 细胞分组同“2.2.1”项。24 h后提取各组总蛋白, 随后进行SDS-PAGE电泳, 每孔30 μg 蛋白量, 最后将蛋白转印到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉溶液封闭2 h, 加入相应的一抗(1:1 000)孵育(4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜)。TBST洗膜4次, IgG-HRP(1:10 000)孵育2 h, TBST洗膜4次, 显

影并采集图像, 随后进行分度值分析, 计算各个蛋白条带的相对表达水平。

2.5 JAK2激动剂C-A1对积雪草酸诱导PC-3细胞线粒体凋亡及相关蛋白表达的影响

PC-3细胞接种24 h后分为对照组(含0.1% DMSO培养基)、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 积雪草酸组、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 积雪草酸+300 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ C-A1组。24 h后Annexin V/PI法检测凋亡率, 方法同“2.2.2”项; JC-1法检测线粒体膜电位变化, 方法同“2.3”项; Western blotting法检测相关蛋白表达, 方法同“2.4”项。

2.6 数据处理与分析

结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并采用统计学软件SPSS 21.0处理数据, 多组间均数采用One-Way ANOVA(单因素方差)分析进行统计学检验。

3 结果

3.1 积雪草酸对PC-3细胞增殖的影响

与同时时间对照组比较, 给药24 h后积雪草酸20~160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、给药48 h后积雪草酸10~160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、给药后72 h积雪草酸10~160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞相对存活率显著降低($P < 0.01$), 积雪草酸作用呈现一定的浓度和时间相关性, 其干预PC-3细胞24、48、72 h后的半数抑制浓度(IC_{50})值分别为29.98、23.04、13.81 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果见图1。

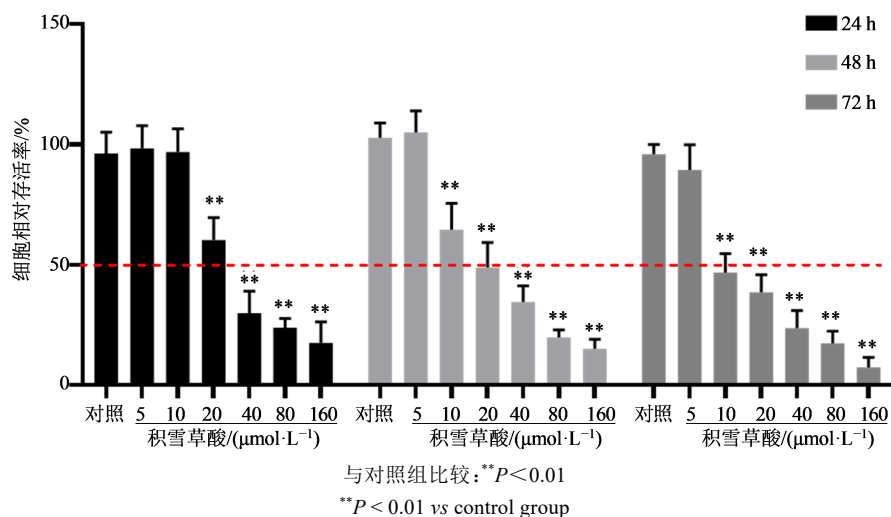


图1 积雪草酸对PC-3细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Fig. 1 Effects of AA on cell viability of PC-3 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.2 积雪草酸对PC-3细胞形态学的影响

如图2所示, 对照组PC-3细胞形态为有触角不规则形; 随着药物浓度的增加, 积雪草酸组部分细胞变成类圆形或圆球形的死亡细胞, 表明积雪草酸可对PC-3细胞产生杀伤作用。

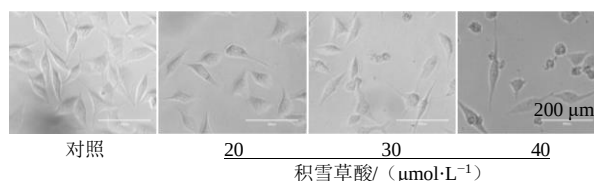


图2 积雪草酸对PC-3细胞形态学的影响

Fig. 2 Effects of AA on cell morphology of PC-3 cells

3.3 积雪草酸对PC-3细胞凋亡的影响

Hoechst 结果如图3所示,对照组PC-3细胞细胞核呈现弥散均匀蓝色荧光,表现状态正常;随着给药浓度增加,积雪草酸组细胞核逐渐出现明显的凋亡特征,如浓染致密的颗粒块状蓝色荧光等,表明积雪草酸可诱导PC-3细胞凋亡。

凋亡率结果见图4,与对照组比较,20、30、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 积雪草酸显著促进PC-3细胞的凋

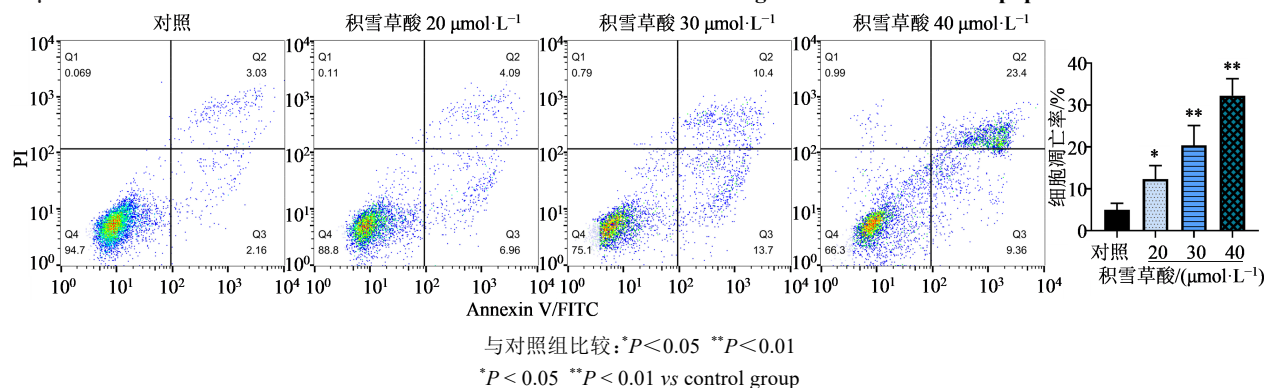


图3 积雪草酸对PC-3细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effects of AA on apoptosis of PC-3 cells

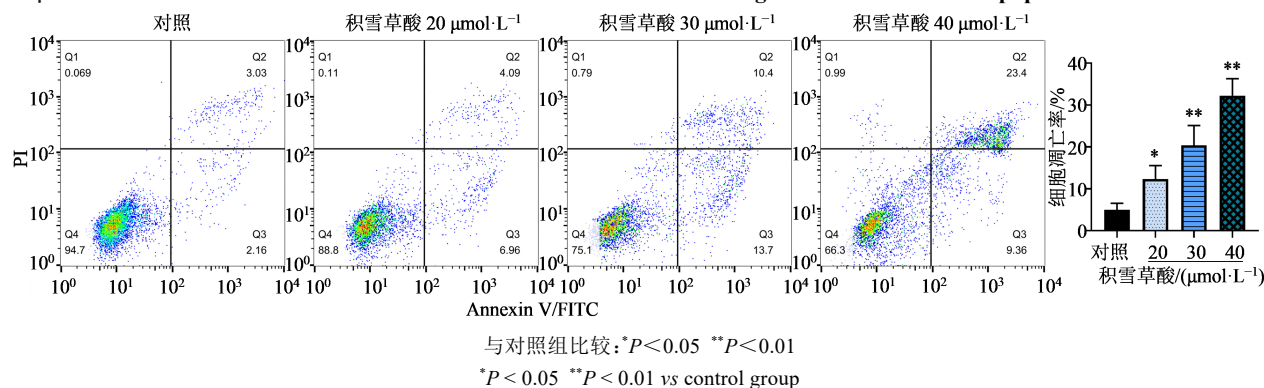


图4 积雪草酸对PC-3细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effects of AA on apoptosis of PC-3 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 积雪草酸对PC-3细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位结果如图5所示,对照组红色荧光较强,说明该组细胞线粒体膜电位正常;随着积雪草酸给药浓度增加,红色荧光逐渐变弱,绿色荧光逐渐加强,红绿荧光Merge亦呈现变绿趋势,说明给药组细胞线粒体膜电位下降。结果表明积雪草酸能促进PC-3细胞线粒体膜电位下降。

3.5 积雪草酸对PC-3细胞相关蛋白表达的影响

Western blotting 结果如图6所示,与对照组比较,20、30、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 积雪草酸显著上调PC-3细胞Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达($P < 0.05$ 、0.01),显著下调Bcl-2蛋白表达($P < 0.05$ 、0.01)。以上表明,积雪草酸可浓度相关地通过线粒体途径诱导PC-3

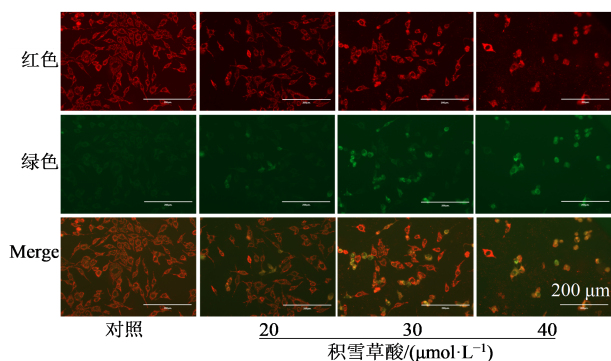


图5 积雪草酸对PC-3细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 5 Effects of AA on mitochondrial membrane potential of PC-3 cells

亡($P < 0.05$ 、0.01),表明积雪草酸可诱导PC-3细胞发生凋亡,且作用呈现浓度相关性。

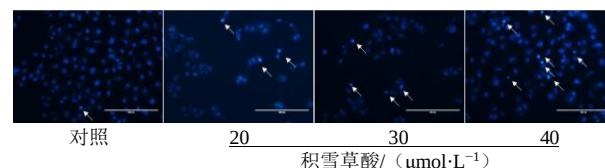


图3 积雪草酸对PC-3细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effects of AA on apoptosis of PC-3 cells

细胞发生凋亡。

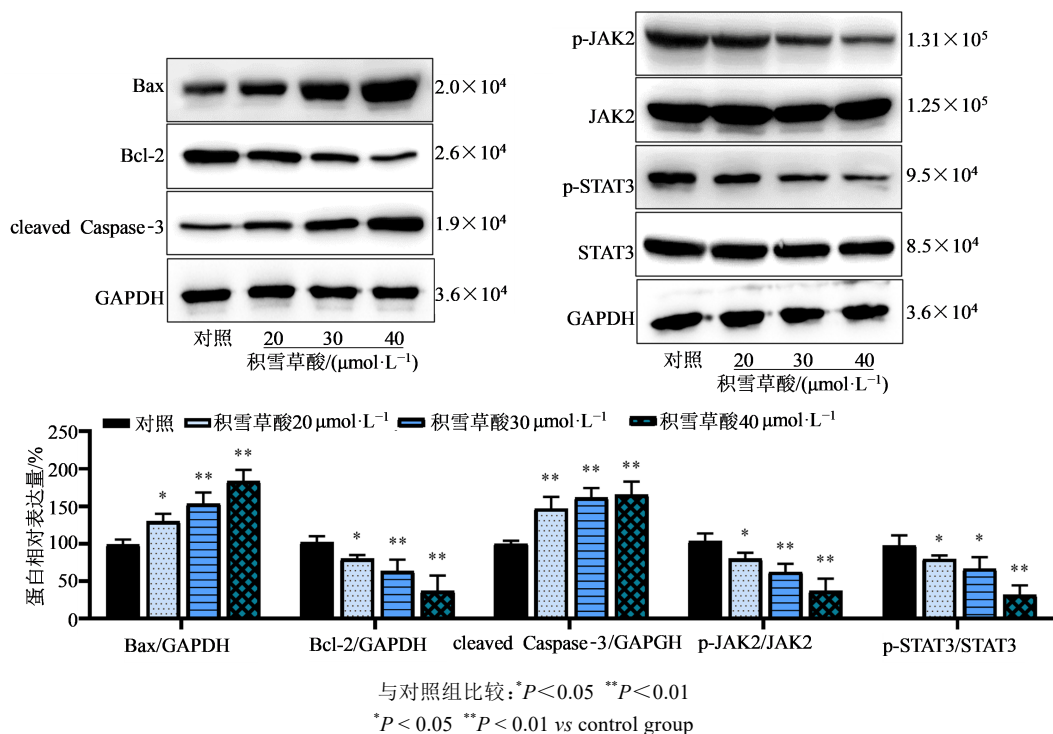
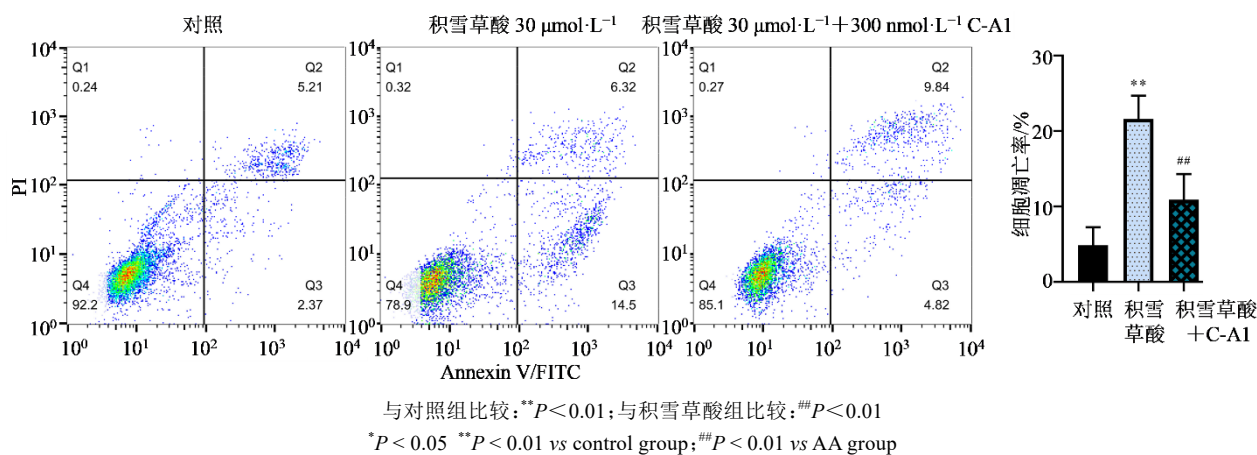
与对照组比较,20、30、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 积雪草酸显著抑制JAK2和STAT3的磷酸化($P < 0.05$ 、0.01)。结果表明,积雪草酸可浓度相关地抑制JAK2/STAT3信号通路,这可能是积雪草酸诱导PC-3细胞发生线粒体凋亡的机制。

3.6 JAK2激动剂C-A1对积雪草酸诱导PC-3细胞线粒体凋亡及相关蛋白表达的影响

为了验证积雪草酸是否通过抑制JAK2/STAT3参与PC-3细胞的凋亡,选用JAK2激动剂C-A1与积雪草酸联用。凋亡率结果如图7所示,与积雪草酸组比较,积雪草酸+C-A1显著抑制PC-3细胞的凋亡($P < 0.01$),说明C-A1能够逆转积雪草酸诱导的PC-3细胞凋亡。

线粒体膜电位结果如图8所示,对照组红色荧光较强,说明该组细胞线粒体膜电位正常;积雪草酸给药干预后,红色荧光减弱,绿色荧光增强,红绿荧光Merge后主要显示绿色,说明积雪草酸组细胞线粒体膜电位下降;而当积雪草酸和C-A1共同干预后,红色荧光增强,绿色荧光减弱, Merge后主要显示红色。结果表明C-A1能够逆转积雪草酸诱导的PC-3细胞线粒体膜电位下降。

Western blotting 结果如图9所示,与积雪草酸组比较,积雪草酸+C-A1显著下调PC-3细胞Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达($P < 0.01$),显著上调

图6 积雪草酸对PC-3细胞蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 6 Effects of AA on the expression of proteins in PC-3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)图7 C-A1对积雪草酸诱导PC-3细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 7 Effect of C-A1 on apoptosis of PC-3 cells induced by AA ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Bcl-2表达($P < 0.01$),显著提升JAK2和STAT3的磷酸化水平($P < 0.01$),表明JAK2激动剂C-A1可通过激活JAK2/STAT3信号通路逆转积雪草酸诱导的PC-3细胞线粒体凋亡,进一步表明积雪草酸可通过抑制JAK2/STAT3信号通路诱导PC-3细胞发生线粒体凋亡。

4 讨论

细胞凋亡是细胞通过激活多种基因并促进其表达,最终有序结束自身生命的一种程序性死亡方式,诱导肿瘤细胞进入凋亡程序是大部分化疗药物发挥的重要途径^[12-13]。线粒体途径是细胞凋亡发生的主要途径之一,Bcl-2家族中的Bax与Bcl-2

蛋白分别发挥促凋亡和抗凋亡作用,能够调控线粒体凋亡,二者的表达变化可导致线粒体膜电位降低及通透性增加^[14],导致线粒体内部凋亡因子如Cyt-C的释放。Cyt-C释放后可以与凋亡因子作用形成凋亡复合体,活化Caspase-9,进一步活化凋亡最终执行蛋白Caspase-3,启动凋亡^[15]。本研究发现,积雪草酸可促进PC-3细胞线粒体膜电位下降,且浓度相关性上调Bax、cleaved Caspase-3表达和下调Bcl-2表达,表明积雪草酸可诱导前列腺癌细胞发生线粒体凋亡。

STAT3是STAT家族成员之一,参与调节多种肿瘤的生物过程,其异常激活在人类肿瘤的发生

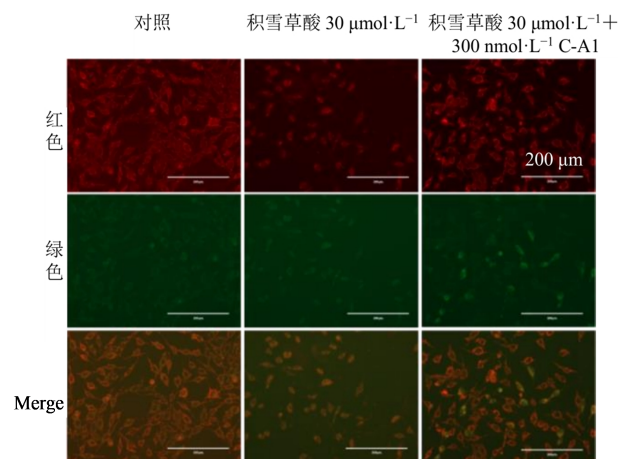


图8 C-A1对积雪草酸诱导PC-3细胞线粒体膜电位下降的影响

Fig. 8 Effect of C-A1 on mitochondrial membrane potential decline induced by AA in PC-3 cells

发展中扮演重要角色^[16]。同时,STAT3是MCL-1表达的主要调节因子,而MCL-1的表达对线粒体凋亡至关重要,其可通过与Bak和Bax结合和分离诱导线粒体凋亡^[17]。JAK家族包括4个成员:JAK1、JAK2、JAK3和Tyk2,其中JAK2与STAT3关系最为密切,激活的JAK2可磷酸化STAT3及其受体^[18-19]。JAK2/STAT3信号通路是JAK/STAT信号通路的重要组成部分,在前列腺癌细胞中持续过度激活,可调控前列腺癌细胞发生凋亡^[20]。有研究显示,白术内酯II可通过调节JAK2/STAT3信号通路诱导前列腺癌细胞凋亡^[21]。花姜酮可通过抑制JAK2/STAT3信号通路抑制激素抵抗性前列腺癌细胞生长并增加其对紫杉醇的敏感性^[22]。β-柠檬酸亦能通过抑制JAK2/STAT3/MCL-1信号通路抑制去势抵抗性前列腺癌细胞的生长并触发细胞凋亡^[23]。本研究发现,

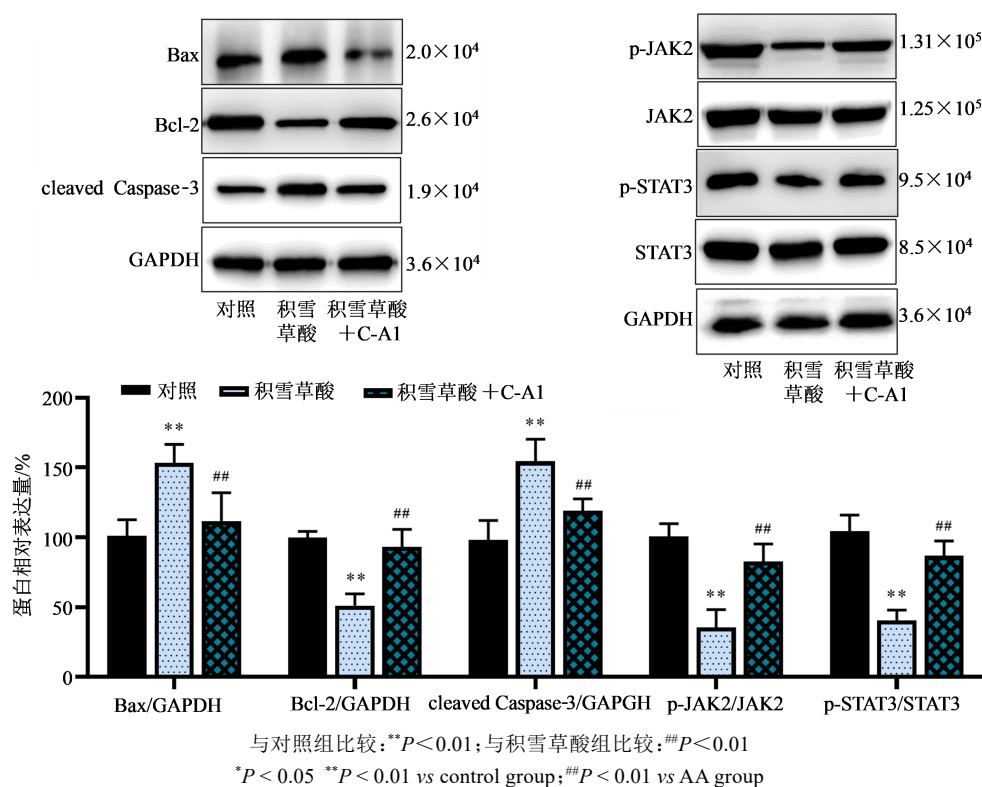


图9 C-A1对积雪草酸诱导PC-3细胞蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of C-A1 on protein expression in PC-3 cells induced by AA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

积雪草酸可浓度相关性地抑制PC-3细胞JAK2和STAT3的磷酸化水平并促进PC-3细胞发生线粒体凋亡,且JAK2激动剂C-A1可逆转积雪草酸诱导的这一凋亡现象。综上研究表明,积雪草酸可通过抑制JAK2/STAT3信号通路诱导PC-3细胞发生线粒体凋亡。

积雪草酸可通过抑制JAK2/STAT3信号通路诱

导前列腺癌细胞发生线粒体凋亡,最终发挥抗前列腺作用。研究结果可为积雪草酸及含积雪草酸中药临床治疗前列腺癌提供有益思路。后期将设计体内实验进一步验证本研究结果,以期提供更为全面的证据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 曾庆琪. 前列腺癌的中医药诊治 [J]. 中国肿瘤外科杂志, 2019, 11(5): 309-312.
Zeng Q Q. Diagnosis and treatment of traditional Chinese medicine for prostate cancer [J]. Chin J Surg Oncol, 2019, 11(5): 309-312.
- [2] Ruan Y, Xu H Q, Ji X Q, et al. BLM interaction with EZH2 regulates MDM2 expression and is a poor prognostic biomarker for prostate cancer [J]. Am J Cancer Res, 2021, 11(4): 1347-1368.
- [3] Huang Y S, Mao J X, Zhang L, et al. Incapitolide A isolated from *Carpesium cernuum* L. inhibits the growth of prostate cancer cells and induces apoptosis via regulation of the PI3K/Akt/xIAP pathway [J]. Oncol Lett, 2021, 21(6): 477.
- [4] Liu X, Yu C, Bi Y, et al. Trends and age-period-cohort effect on incidence and mortality of prostate cancer from 1990 to 2017 in China [J]. Public Health, 2019, 172: 70-80.
- [5] Remmers S, Roobol M J. Personalized strategies in population screening for prostate cancer [J]. Int J Cancer, 2020, 147(11): 2977-2987.
- [6] Grasso C S, Wu Y M, Robinson D R, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer [J]. Nature, 2012, 487(7406): 239-243.
- [7] 刘嘉, 严宝飞, 张景正, 等. 积雪草酸对前列腺癌细胞增殖及转化生长因子 $\beta 1$ 诱导的上皮间质转化的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(2): 151-157.
Liu J, Yan B F, Zhang J Z, et al. Effects of asiatic acid on proliferation of prostate cancer cells and epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- $\beta 1$ [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2022, 33(2): 151-157.
- [8] Lian G Y, Wang Q M, Mak T S, et al. Inhibition of tumor invasion and metastasis by targeting TGF- β -Smad-MMP2 pathway with asiatic acid and naringenin [J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, 20: 277-289.
- [9] Ren L, Cao Q X, Zhai F R, et al. Asiatic acid exerts anticancer potential in human ovarian cancer cells via suppression of PI3K/Akt/mTOR signalling [J]. Pharm Biol, 2016, 54(11): 2377-2382.
- [10] Gou X J, Bai H H, Liu L W, et al. Asiatic acid interferes with invasion and proliferation of breast cancer cells by inhibiting WAVE3 activation through PI3K/AKT signaling pathway [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 1874387.
- [11] 严宝飞, 段金庭, 张景正, 等. 忍冬藤提取物诱导骨肉瘤细胞凋亡的作用及机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 3923-3932.
Yan B F, Duan J N, Zhang J Z, et al. Mechanism of apoptosis induced by *Lonicera japonica* extract on osteosarcoma cells [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(13): 3923-3932.
- [12] 李龙妹, 黄锦鹏, 河文峰, 等. 龙葵提取物澳洲茄碱诱导 A549 细胞凋亡的机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(12): 1422-1427.
Li L M, Huang J P, He W F, et al. Molecular mechanism of apoptosis induced by solasonine extracted from *Solanum nigrum* in A549 cells [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(12): 1422-1427.
- [13] Jan R, Chaudhry G E. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics [J]. Adv Pharm Bull, 2019, 9(2): 205-218.
- [14] Delbridge A R D, Grabow S, Strasser A, et al. Thirty years of BCL-2: Translating cell death discoveries into novel cancer therapies [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(2): 99-109.
- [15] Günther C, Martini E, Wittkopf N, et al. Caspase-8 regulates TNF- α -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis [J]. Nature, 2011, 477(7364): 335-339.
- [16] Siveen K S, Sikka S, Surana R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1845(2): 136-154.
- [17] Jo M J, Jeong S, Yun H K, et al. Genipin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis via downregulation of Stat3/mcl-1 pathway in gastric cancer [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 739.
- [18] Levy D E, Darnell J E. Stats: Transcriptional control and biological impact [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(9): 651-662.
- [19] Hou S X, Zheng Z Y, Chen X, et al. The Jak/STAT pathway in model organisms: Emerging roles in cell movement [J]. Dev Cell, 2002, 3(6): 765-778.
- [20] Liu Y W, Wang L J, Wu Y P, et al. Pterostilbene exerts antitumor activity against human osteosarcoma cells by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Toxicology, 2013, 304: 120-131.
- [21] Jing W, Nasser M I, Adlat S, et al. Atractylenolide II induces apoptosis of prostate cancer cells through regulation of AR and JAK2/STAT3 signaling pathways [J]. Molecules, 2018, 23(12): 3298.
- [22] Jorvig J E, Chakraborty A. Zerumbone inhibits growth of hormone refractory prostate cancer cells by inhibiting JAK2/STAT3 pathway and increases paclitaxel sensitivity [J]. Anticancer Drugs, 2015, 26(2): 160-166.
- [23] Bao X W, Zhu J W, Ren C X, et al. β -elemonic acid inhibits growth and triggers apoptosis in human castration-resistant prostate cancer cells through the suppression of JAK2/STAT3/MCL-1 and NF- κ B signal pathways [J]. Chem Biol Interact, 2021, 342: 109477.