

基于 IL-6/STAT3 信号通路研究冬凌草甲素对乳腺癌细胞的作用及机制

黎乃维, 王 飞*, 尧子钊, 王剑石

南昌大学抚州医学院, 江西 抚州 344000

摘要:目的 基于白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)/信号传导及转录激活蛋白 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路研究冬凌草甲素对乳腺癌细胞增殖、自噬和凋亡的影响, 并进一步探究冬凌草甲素对乳腺癌细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响。方法 通过 MTT 法检测冬凌草甲素对 MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-MB-468 乳腺癌细胞增殖的影响; 采用 GFP-LC3 荧光斑点检测冬凌草甲素对 MDA-MB-468 细胞自噬的影响; 采用 DAPI 染色法观察冬凌草甲素对 MDA-MB-468 细胞生长抑制的影响; 采用流式细胞仪测定冬凌草甲素对 MDA-MB-468 细胞凋亡的影响; 利用稳定转染 STAT3-luciferase 报告基因质粒的 HepG2-STAT1/3-Luc 细胞, 检测冬凌草甲素对 IL-6/STAT3 信号通路的作用; 采用 Western blotting 检测冬凌草甲素对 STAT3 磷酸化的影响以及对细胞增殖及凋亡相关蛋白表达的影响。结果 冬凌草甲素抑制乳腺癌细胞增殖, 诱导乳腺癌细胞自噬和凋亡作用, 呈剂量相关性; 冬凌草甲素对 IL-6/STAT3 信号通路和 STAT3 磷酸化均有明显的抑制作用; 冬凌草甲素能够上调乳腺癌细胞 p53、剪切型多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (cleaved poly ADP-ribose polymerase, cleaved PARP)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 以及 Caspase-9 蛋白表达。结论 冬凌草甲素通过抑制 STAT3 磷酸化而抑制 IL-6/STAT3 信号通路的激活, 并能上调 p53、cleaved PARP、cleaved Caspase-3 及 cleaved Caspase-9 蛋白表达, 进而抑制乳腺癌细胞增殖, 诱导乳腺癌细胞的自噬和凋亡。

关键词: 冬凌草甲素; 乳腺癌; 细胞增殖; 自噬; 凋亡; 白细胞介素-6/信号传导及转录激活蛋白 3 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)13-4046-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.018

Effect and mechanism of oridonin on breast cancer cells based on IL-6/STAT3 signaling pathway

LI Nai-wei, WANG Fei, RAO Zi-zhao, WANG Jian-shi

Fuzhou Medical College, Nanchang University, Fuzhou 344000, China

Abstract: Objective To study the effect of oridonin on proliferation and autophagy of breast cancer cells based on interleukin-6 (IL-6)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway, and further explore the effect of oridonin on proliferation and apoptosis-related protein expressions of breast cancer cells. **Methods** Effect of oridonin on proliferation of MDA-MB-231, MDA-MB-453 and MDA-MB-468 breast cancer cells was detected by MTT method; Effect of oridonin on autophagy of MDA-MB-468 cells was detected by GFP-LC3 fluorescent spots; Effect of oridonin on nuclear morphology of MDA-MB-468 cells was observed by DAPI staining; Effect of oridonin on apoptosis of MDA-MB-468 cells was determined by flow cytometry; Effect of oridonin on IL-6/STAT3 signaling pathway was detected by HepG2-STAT1/3-Luc cells stably transfected with STAT3-luciferase reporter gene plasmid; Effect of oridonin on phosphorylation of STAT3 and cell proliferation and apoptosis-related protein expressions was detected by Western blotting. **Results** Oridonin inhibited the proliferation of breast cancer cells, induced autophagy and apoptosis of breast cancer cells in a dose-dependent manner; Oridonin significantly inhibited IL-6/STAT3 signaling pathway and STAT3 phosphorylation; Oridonin up-regulated p53, cleaved poly ADP-ribose polymerase (cleaved PARP), cleaved caspase-aspartic protease-3 (cleaved Caspase-3) and Caspase-9 protein expressions in breast cancer cells. **Conclusion** Oridonin may inhibit the activation of IL-6/STAT3 signaling pathway by inhibiting the phosphorylation of STAT3, and up-regulate protein expressions of p53, cleaved PARP, cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9, thereby inhibiting the proliferation of breast cancer cells, inducing autophagy and apoptosis.

收稿日期: 2022-02-17

基金项目: 江西省卫生健康委科技计划项目 (SKJP220210301); 抚州市科技计划项目 (109025488028)

作者简介: 黎乃维 (1982—), 女, 博士研究生, 主要从事药物研究。E-mail: 18992685@qq.com

*通信作者: 王 飞 (1980—), 副教授。Tel: (0794)8251669 E-mail: 28010495@qq.com

in breast cancer cells.

Key words: oridonin; breast cancer; cell proliferation; autophagy; apoptosis; interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway

乳腺癌为我国女性发病率最高的癌症,居相关死亡原因第 5 位,严重威胁女性健康。乳腺癌为异质性疾病,病理类型可分为非浸润、早期浸润癌和浸润癌,分子分型临床上可分为 4 类: Luminal A 型(HR+, HER2-)、Luminal B 型(HR+, HER2+)、HER2+型(HR-, HER2+)和三阴型(HR-, HER2-),其中 Luminal A 型和三阴型均为 HER2 阴性乳腺癌,占晚期乳腺癌的 80%,这意味着接近 80%的乳腺癌患者不适合 HER2 靶向治疗。针对这部分患者的治疗方案,目前主要以化疗和内分泌治疗为主,但治疗效果并不理想^[1-6]。

冬凌草为唇形科植物碎米桠 *Isodon rubescens* (Hemsley) H. Hara 的干燥地上部分,具有清热解毒、健胃活血、消炎止痛、抗肿瘤等作用。冬凌草的主要有效成分为冬凌草甲素,能够通过阻断细胞周期、诱导细胞凋亡、诱导自噬、下调端粒酶活性、逆转多药耐药等多种方式发挥抗肿瘤作用,是一种潜在的抗癌候选新药^[7-20]。研究发现,冬凌草甲素可以通过抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 或者激活有丝分裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK),从而抑制肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)等促炎性细胞因子的释放^[21-22]。信号传导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是多种生长因子或细胞因子信号通路激活的关键点, STAT3 通路的激活可以诱导肿瘤细胞的增殖,而其抑制可以促进肿瘤细胞的凋亡。多种细胞因子可以通过细胞膜上相应的酪氨酸激酶相关受体来激活 STAT3 信号通路完成信号传导。在大多数人类癌症中可见通过酪氨酸第 705 位点磷酸化实现的 STAT3 过度激活。研究显示,在他莫昔芬耐药的乳腺癌 MCF7 细胞中 STAT3 酪氨酸第 705 位点磷酸化水平升高^[23]。因此,本研究考察冬凌草甲素对乳腺癌细胞增殖、自噬、凋亡以及 IL-6/STAT3 信号通路的影响,为冬凌草甲素治疗乳腺癌的应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

人乳腺癌 MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-

MB-468 细胞株由中国科学院上海细胞库所提供。

1.2 药品与试剂

冬凌草甲素(批号 PHL89745,质量分数 $\geq 98\%$)购自美国 Merck 公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、RPMI 1640 培养基、 α -MEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;DAPI 染液购自 Boster 公司;荧光素酶检测试剂盒购自美国 Promega 公司;流式检测试剂盒购自 Yeasen 公司;IL-6 购自上海博升生物科技有限公司;STAT3 抗体(批号 AF1492)、p-STAT3 抗体(批号 AF5941)、 β -actin 抗体(批号 AP0060-100)购自美国 CST 公司;Western blotting 所用抗体均购于美国 Sigma 公司;p53 抗体(批号 P6874)、剪切型多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(cleaved poly ADP-ribose polymerase, cleaved PARP)抗体(批号 SAB2108195)、PARP 抗体(批号 P7065)、细胞色素 C (cytochrome C, CytC) 抗体、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (cleaved cystein-aspartate protease-9, cleaved Caspase-9) 抗体(批号 C8726)、cleaved Caspase-3 抗体(批号 SAB1305630)、B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 抗体(批号 SRP0186)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体(批号 SAB4502546)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体(批号 G5262)购自美国 Sigma 公司;GFP-LC3 脂质体复合物(批号 C3011)购自山西碧云天生物科技有限公司。

1.3 仪器

倒置显微镜(德国 Leica 公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);酶标仪(瑞士 Tecan 公司);超净工作台(苏州净化设备厂);TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂);DYY-6c 型电泳仪(北京六一仪器厂);Facscllbar 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-MB-468 细胞用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 RPMI 1640 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

稳定转染 STAT3-luciferase 报告基因质粒的细胞 (HepG2-STAT1/3-Luc) 用含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 MTT 法检测冬凌草甲素对乳腺癌细胞增殖的影响

MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-MB-468 细胞分别以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板, 100 μ L/孔, 培养 24 h。分别加入 1、5、10 μ mol/L 的冬凌草甲素处理细胞 (冬凌草甲素溶于 DMSO 配制成 10 mol/L 的溶液, 以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释至所需浓度, 使 DMSO 终质量分数 < 0.1%), 每组设置 3 个平行孔, 同时设置对照组 (加入不含药物的培养基)。培养 48 h 后再加入含 0.5 mg/mL MTT 的培养基, 孵育 4 h 后, 加入 DMSO, 用酶标仪测定吸光度 (A) 值。

2.3 DAPI 染色检测细胞状态

取处于对数生长期的 MDA-MB-468 细胞, 以 2×10^4 个/mL 接种于 6 孔板中的爬片, 分别加入冬凌草甲素 (1、5、10 μ mol/L) 处理 24 h 后, 以预冷的 70% 乙醇固定, 加入 1 μ g/mL DAPI 染液染色 2~3 min, 弃去染料, PBS 漂洗 1 次, 使用荧光显微镜观察细胞的状态。

2.4 荧光斑点检测细胞自噬水平

取处于对数生长期的 MDA-MB-468 细胞, 以 2×10^4 个/mL 接种于 6 孔板, 2 mL/孔, 培养 24 h。加入 GFP-LC3 脂质体复合物, 继续孵育 24 h, 观察细胞与脂质体融合状态, 当细胞与脂质体融合度达到 60%~80%, 吸出脂质体混合物, 分别给予冬凌草甲素 (1、5、10 μ mol/L) 处理细胞, 同时设置对照组 (加入不含药物的培养基), 培养 48 h 后于倒置荧光显微镜下观察细胞内荧光斑点的数目。

2.5 细胞凋亡检测

取处于对数生长期的 MDA-MB-468 细胞, 以 2×10^4 个/mL 接种于 6 孔板, 2 mL/孔, 培养 24 h。分别给予冬凌草甲素 (1、5、10 μ mol/L) 处理细胞 24 h 后, 收集细胞, 吸取 100 μ L 稀释至 1×10^6 /mL 的细胞悬液, 加入 400 μ L 结合缓冲液、5 μ L Annexin V/FITC 和 10 μ L 碘化丙啶 (PI), 混匀后室温避光孵育 15 min, 采用流式细胞仪上样检测。

2.6 Luciferase 活性测定

取处于对数生长期的 HepG2-STAT1/3-Luc 细胞, 以 2×10^5 个/mL 接种于 96 孔板, 100 μ L/孔, 培养 48 h。分别加入 100 μ L 冬凌草甲素 (1、5、10

μ mol/L) 处理 1 h 后, 每孔加入 10 μ L IL-6 (50 ng/mL) 孵育 5.5 h, 加入 30 μ L 细胞裂解液, 振荡使细胞充分裂解, 采用酶标仪测定荧光强度。

2.7 Western blotting 检测 IL-6/STAT3 信号通路、增殖和凋亡相关蛋白表达

2.7.1 HepG2-STAT1/3-Luc 细胞中 IL-6/STAT3 信号通路相关蛋白表达, 取处于对数生长期的 HepG2-STAT1/3-Luc 细胞, 以 3000 个/mL 接种于 6 孔板, 2 mL/孔, 培养 24 h。分别给予冬凌草甲素 (1、5、10 μ mol/L) 处理细胞 24 h 后, 每孔加入 10 μ L IL-6 (50 ng/mL) 孵育 1 h, 收集细胞。使用蛋白提取试剂盒提取总蛋白, 加入 $5 \times$ 上样缓冲液, 沸水浴煮沸 5 min。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入脱脂牛奶室温封闭 1 h, 分别加入一抗, 4 °C 孵育过夜; PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入相应二抗室温孵育 2 h, PBST 洗膜后, 用 ECL 发光试剂显影。

2.7.2 MDA-MB-468 细胞中增殖和凋亡相关蛋白表达 取处于对数生长期的 MDA-MB-468 细胞, 以 2×10^5 个/mL 接种于 6 孔板, 2 mL/孔, 培养 24 h。分别给予冬凌草甲素 (1、5、10 μ mol/L) 处理细胞 24 h 后, 收集细胞。按“2.7.1”项下方法检测增殖和凋亡相关蛋白表达。

2.8 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验进行分析, 多组间差异采用 One-way ANOVA 分析, 采用 LSD 法进行多重比较。

3 结果

3.1 冬凌草甲素抑制乳腺癌细胞的增殖

如图 1 所示, 冬凌草甲素能抑制 MDA-MB-453、MDA-MB-231、MDA-MB-468 乳腺癌细胞的增殖, 且呈剂量相关性。

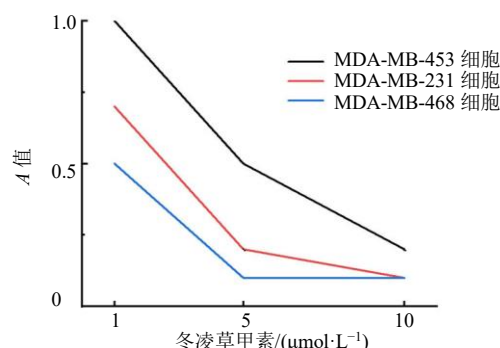


图 1 冬凌草甲素抑制乳腺癌细胞增殖 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Oridonin inhibits proliferation of breast cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 冬凌草甲素影响乳腺癌细胞的形态

如图 2 所示, 对照组未见细胞明显凋亡, 细胞核呈椭圆形; 冬凌草甲素组 MDA-MB-468 细胞数量明显减少, 冬凌草甲素 ($10 \mu\text{mol/L}$) 组大量细胞体积略缩小, 细胞间连接消失, 空隙变大, 并从培养皿中脱离, 细胞核呈凋亡核形态, 即核体积减小, 在高倍镜下可观察到细胞凋亡的形态。表明冬凌草甲素可以诱导细胞凋亡。

3.3 冬凌草甲素诱导乳腺癌细胞的自噬

如图 3 所示, 冬凌草甲素组细胞内自噬标志蛋白 LC3 荧光斑点数量及荧光强度明显增加, 表明冬凌草甲素能够诱导细胞自噬, 且呈剂量相关性。

3.4 冬凌草甲素诱导乳腺癌细胞凋亡

如图 4 所示, 乳腺癌 MDA-MB-468 细胞给予冬凌草甲素处理 24 h 后, 早期凋亡和晚期凋亡细胞比例均升高, 且呈剂量相关性, 表明冬凌草甲素能够诱导乳腺癌细胞凋亡。

3.5 冬凌草甲素抑制 IL-6/STAT3 信号通路激活

如图 5-A 所示, 给予 IL-6 刺激后, HepG2-STAT1/3-Luc 细胞荧光强度明显升高 ($P < 0.05$); 给予冬凌草甲素后, HepG2-STAT1/3-Luc 细胞荧光强度明显降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 表明冬凌草甲素能够抑制 IL-6/STAT3 通路的激活, 从而抑制炎症小体的激活。如图 5-B 所示, 给予 IL-6 刺激

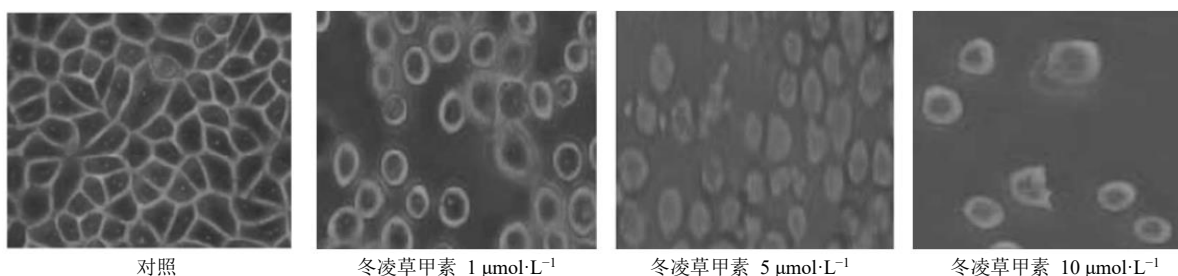


图 2 冬凌草甲素诱导乳腺癌细胞凋亡形态变化 (×400)

Fig. 2 Morphological changes of apoptosis of breast cancer cells induced by oridonin (× 400)

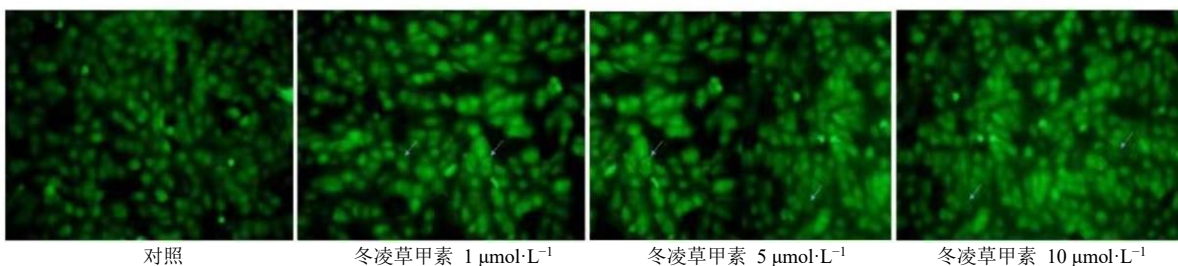


图 3 冬凌草甲素诱导乳腺癌细胞自噬 (×400)

Fig. 3 Oridonin induces autophagy of breast cancer cells (× 400)

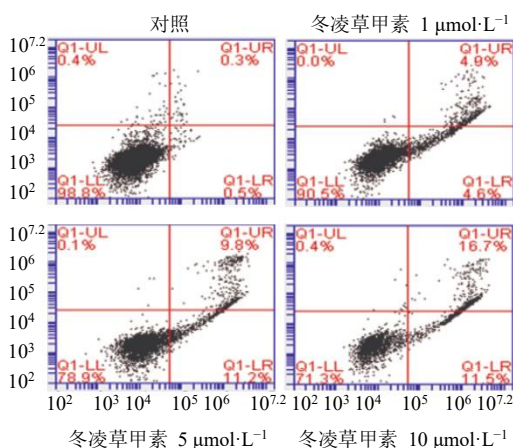
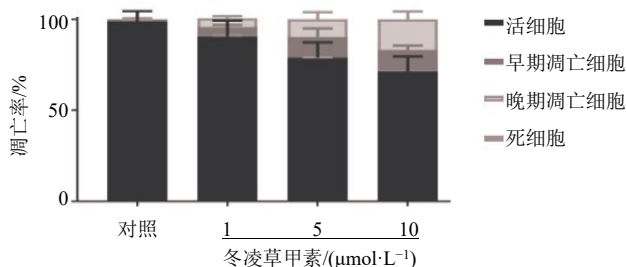


图 4 冬凌草甲素诱导乳腺癌细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Oridonin induces apoptosis of breast cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



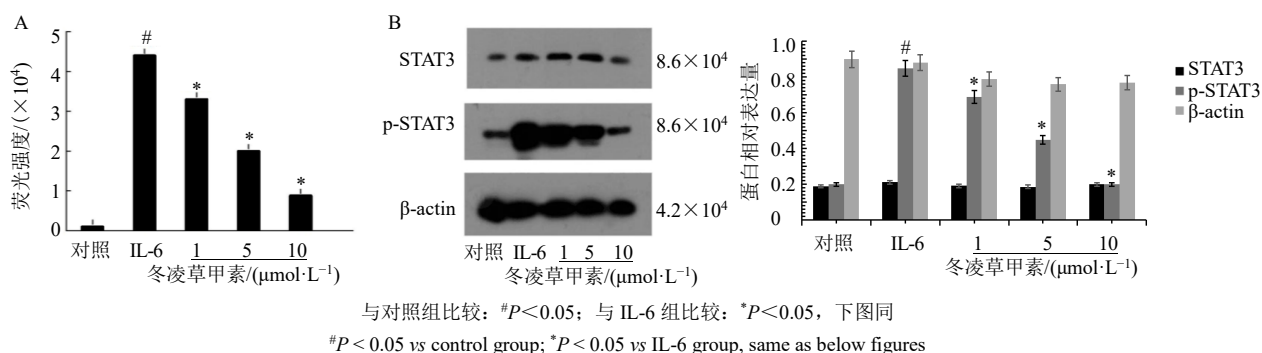


图 5 冬凌草甲素对 IL-6 诱导的 HepG2-STAT1/3-Luc 细胞荧光强度 (A) 和 p-STAT3、STAT3 蛋白表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of oridonin on fluorescence intensity of HepG2-STAT1/3-Luc cells (A) and p-STAT3, STAT3 protein expressions induced by IL-6 (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

后, HepG2-STAT1/3-Luc 细胞 p-STAT3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 给予冬凌草甲素后, HepG2-STAT1/3-Luc 细胞 p-STAT3 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性。表明冬凌草甲素通过抑制 STAT3 的磷酸化而抑制 IL-6/STAT3 通路的激活, 进而诱导乳腺癌细胞自噬, 抑制乳腺癌细胞增殖。

3.6 冬凌草甲素影响乳腺癌细胞增殖和凋亡有关蛋白表达

如图 6 所示, 冬凌草甲素能够显著上调 p53、

cleaved PARP、CytC、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 下调 PARP、Bcl-2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。提示冬凌草甲素能够通过启动内源和外源性途径诱导乳腺癌细胞凋亡。

4 讨论

冬凌草是 20 世纪 70 年代发现的抗癌抗菌消炎中草药, 中国科学院昆明植物研究所孙汉董院士从冬凌草中提取出抗癌、抗菌、消炎的活性成分冬凌

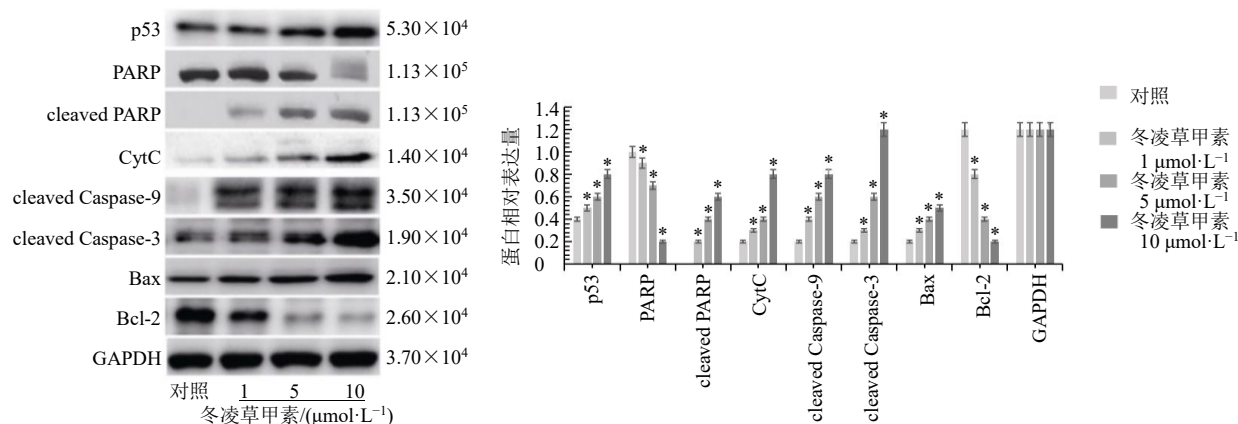


图 6 冬凌草甲素对乳腺癌细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of oridonin on expressions of proliferation and apoptosis related proteins in breast cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

草甲素。经临床试验证实, 冬凌草及其提取物冬凌草甲素对多种肿瘤有效, 尤其是对于我国北方地区发病率较高的食管癌和胃癌最为敏感。同时, 冬凌草与化疗药联合使用能够提高化疗药的抗肿瘤作用, 并降低其不良反应。冬凌草甲素具有明确的抗肿瘤作用, 其在部分瘤种中的抗肿瘤作用机制已初步阐明。研究表明, 冬凌草甲素可以促进非小细胞肺癌 Bax 表达而抑制 Bcl-2 表达, 从而促进肺癌细

胞凋亡; 冬凌草甲素不仅调控胰腺癌细胞 Bax/Bcl-2 表达, 而且促进 CytC 从线粒体释放, 从而诱导线粒体凋亡途径^[23-24]。但冬凌草甲素对乳腺癌细胞的作用和机制尚未有深入研究。

STAT3 信号通路是多种细胞因子和生长因子在细胞内传递信号的共同途径, 广泛参与细胞增殖、分化、凋亡以及炎症和自噬等过程, 可以通过负调节因子、与其他信号通路作用、共价修饰等多种途

径进行调节,在很多恶性肿瘤中过度表达和活化,与乳腺癌细胞增殖有着密切的关系。抑制 STAT3 的表达或活化能够抑制肿瘤细胞生长,促进肿瘤细胞凋亡^[23-27]。在多数人类癌症中,肿瘤细胞可通过酪氨酸第 705 位点的磷酸化实现 STAT3 过渡激活,此外,IL-6 也可通过细胞膜上相应的酪氨酸激酶相关受体来激活 STAT3 信号通路,最终诱导肿瘤细胞的增殖。抑制 IL-6/STAT3 信号通路的激活,可促进肿瘤细胞的凋亡^[28-29]。本研究发现,冬凌草甲素能够抑制 IL-6/STAT3 通路和 STAT3 磷酸化,综合 GFP-LC3 荧光斑点实验结果,发现冬凌草甲素可能通过抑制 STAT3 的磷酸化而抑制 IL-6/STAT3 信号通路的激活,从而抑制乳腺癌细胞的增殖,并诱导了乳腺癌细胞自噬和凋亡。

细胞凋亡途径可分为内源性和外源性途径,最终都通过 Caspase-3 活化启动凋亡进程,外源性途径以 Caspase-9 的活化等为代表,而内源性途径则以线粒体膜上 CytC 的释放为代表。p53 基因是人类肿瘤相关性最高的基因,p53 基因广泛分布于核仁、线粒体等结构中,参与细胞周期调控、细胞凋亡及维持基因组稳定等过程。已有研究表明 p53 基因可同时诱导内源性和外源性凋亡的发生,p53 基因上调后,细胞损伤后的监控增强,有 DNA 损伤的细胞无法进入复制周期,继而走向凋亡^[30-34]。本研究发现,冬凌草甲素能够上调 p53 表达,导致细胞监控加强,从而使肿瘤细胞不能进入复制周期;同时研究还发现,随着冬凌草甲素浓度升高,细胞凋亡相关蛋白(cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、CytC)表达水平逐渐升高,最终共同导致了乳腺癌细胞的凋亡。结合 DAPI 染色法观察乳腺癌细胞核形态学特征结果,冬凌草甲素可通过提高多种凋亡蛋白活性,最终导致乳腺癌细胞凋亡。

综上所述,本研究发现冬凌草甲素能够通过抑制 STAT3 信号通路,上调 p53 蛋白、PARP、Caspase-3 活化形式以及 Caspase-9 活化形式表达等,从而诱导乳腺癌细胞自噬和凋亡,并抑制乳腺癌细胞增殖。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Fan L, Strasser-Weippl K, Li J J, et al. Breast cancer in China [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e279-e289.
- [2] 李贺,郑荣寿,张思维,等. 2014 年中国女性乳腺癌发病与死亡分析 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2018, 40(3): 166-171.

- [3] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30.
- [4] Allemani C, Matsuda T, Carlo V D, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): Analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. *Lancet*, 2018, 391(10125): 1023-1075.
- [5] Provenzano E, Ulaner G A, Chin S F. Molecular classification of breast cancer [J]. *PET Clin*, 2018, 13(3): 325-338.
- [6] Shi Y Q, Jin J, Ji W F, et al. Therapeutic landscape in mutational triple negative breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 99.
- [7] 李春雨,王琪,申坤,等. 冬凌草甲素对人黑色素瘤 A375 细胞侵袭和转移的影响及机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(3): 658-662.
- [8] 俞文英,马建琦,方杰,等. 冬凌草甲素聚乙二醇功能化氧化石墨烯纳米粒的制备及抗结肠癌实验研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(19): 3954-3960.
- [9] 赫玮,左勇. 冬凌草甲素上调 PLK1 对 Jurkat 细胞细胞周期的影响 [J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2021, 41(5): 603-611.
- [10] 王景,刘晶,魏旭静,等. 冬凌草甲素对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞增殖、迁移和侵袭及 lncRNA CCAT1 表达的影响 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2021, 47(2): 384-389.
- [11] 谢谭芳,朱小勇,黄天衍. 壳聚糖氧化石墨烯负载冬凌草甲素对 A549 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国药房*, 2021, 32(13): 1589-1595.
- [12] 贺守第,王健雄,马港圆,等. 冬凌草甲素通过 NF-kappaB 信号通路对 LPS 刺激树突状细胞的影响 [J]. *南昌大学学报: 医学版*, 2021, 61(2): 13-17.
- [13] 刘晖,赵春英,郑洁,等. 冬凌草甲素通过上调 p53 抑制三阴性乳腺癌细胞增殖并诱导凋亡的机制 [J]. *实用癌症杂志*, 2021, 36(6): 891-894.
- [14] 杨鹏,赵美兰,杨宇慎,等. 冬凌草甲素与奥沙利铂联合应用抑制结肠癌肝转移的实验研究 [J]. *吉林中医药*, 2021, 41(6): 784-787.
- [15] 王佐,王璐,陈忠正,等. 冬凌草甲素诱导小鼠肝癌细胞还原酶活性及其机理研究 [J]. *食品科学*, 2017, 38(7): 193-200.
- [16] 黄清波. 冬凌草甲素对甲状腺癌细胞放射敏感性的影响及机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(1): 185-190.
- [17] 刘建群,高俊博,刘小红. 热分析法研究冬凌草甲素的热稳定性和分解动力学 [J]. *林产化学与工业*, 2015, 35(6): 119-125.
- [18] 杨宏静,方应权,沈庆坤,等. 冬凌草甲素衍生物的合成

- 成及其抗肿瘤活性研究 [J]. 化学试剂, 2021, 43(2): 147-151.
- [19] 刘艺, 郭金兴. 冬凌草甲素抑制人卵巢癌细胞恶性行为及机制研究 [J]. 现代预防医学, 2021, 48(1): 139-143.
- [20] 刘荣兴, 胡培, 马妍, 等. 冬凌草甲素抑制 HCT116 细胞增殖与 p38 MAPK 信号通路相关性研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(2): 200-205.
- [21] Huang J, Wu L J, Tashiro S, *et al.* A comparison of the signal pathways between the TNF alpha- and oridonin-induced murine L929 fibrosarcoma cell death [J]. *Acta Med Okayama*, 2005, 59(6): 261-270.
- [22] Xu Y, Xue Y, Wang Y, *et al.* Multiple-modulation effects of oridonin on the production of proinflammatory cytokines and neurotrophic factors in LPS-activated microglia [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(3): 360-365.
- [23] 崔莎莎. 疏肝益肾方对乳腺癌微环境中外泌体串扰介导他莫昔芬耐药性的研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2021.
- [24] 何国浓, 贺志良, 王邦才, 等. 冬凌草甲素靶向 Sema4D 抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 3842-3846.
- [25] 邱雯莉. 载冬凌草甲素靶向 GPC1 多模态分子探针在胰腺癌诊疗一体化中的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [26] 张锦锦, 唐慧. JAK/STAT3 信号通路调控肿瘤及其相关生物功能的研究进展 [J]. 基础医学与临床, 2017, 37(10): 1456-1460.
- [27] 尹建国, 张社兵, 彭道泉. 载脂蛋白 AI 通过 JAK2/STAT3 信号通路抑制肿瘤坏死因子 α 的转录表达 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(6): 566-570.
- [28] 杨毅, 袁杰, 牛瑞芳. STAT3 的多重调控方式在肿瘤中的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(8): 352-357.
- [29] 邢济麟. SIRT4 通过抑制 IL-6/STAT3 信号通路增强雌激素受体阳性乳腺癌对他莫昔芬的敏感性 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.
- [30] Li P, Zhou L B, Zhao T, *et al.* Caspase-9: Structure, mechanisms and clinical application [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14): 23996-24008.
- [31] An H K, Chung K M, Park H, *et al.* CASP9 (caspase 9) is essential for autophagosome maturation through regulation of mitochondrial homeostasis [J]. *Autophagy*, 2020, 16(9): 1598-1617.
- [32] Amaral J D, Xavier J M, Steer C J, *et al.* The role of p53 in apoptosis [J]. *Discov Med*, 2010, 9(45): 145-152.
- [33] Kanapathipillai M. Treating p53 mutant aggregation-associated cancer [J]. *Cancers*, 2018, 10(6): E154.
- [34] Stein Y, Rotter V, Aloni-Grinstein R. Gain-of-function mutant p53: All the roads lead to tumorigenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6197.

[责任编辑 李亚楠]