

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.01.005

• 基础研究 •

去甲斑蝥素通过JAK-STAT3途径诱导结肠癌LS-174T细胞凋亡



张国建¹, 李猛^{1*}, 王天阳², 石钺³, 王晨宇⁴, 闫庆辉¹

Norcantharidin Induced Apoptosis of Human Colon Carcinoma Cells LS-174T through Inhibiting JAK-STAT3 Signal Pathway

ZHANG Guojian¹, LI Meng^{1*}, WANG Tianyang², SHI Cheng³, WANG Chenyu⁴, YAN Qinghui¹(*: Contributed equally as first author)

1. Department of Anorectal Surgery, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China, 2. Department of Hepatobiliary Surgery, 3. Department of Spleen and Stomach Diseases, Chinese Medicine Hospital of Hebei Province; 4. Department of Minimally Invasive Surgery, The Second Hospital of Hebei Medical University
Corresponding Author: YAN Qinghui, E-mail: YQH3868@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of norcantharidin(NCTD) on the apoptosis of human colon carcinoma cells LS-174T and its possible molecular mechanism. **Methods** MTT assay was used to detect the effects of NCTD on growth inhibition in LS-174T cells. Acridine orange/ ethidium (AO/EB) bromide double staining and transmission electron microscope technique were used to observe the changes of cellular morphology and ultrastructure. AnnexinV/PI staining was used to detect the rate of apoptosis. Western blot was used to assess the protein levels of stat3, survivin, Mcl-1 and bax. **Results** NCTD significantly inhibited LS-174T cells growth in a time- and dose-dependent manner(5, 10, 20, 40 μg/ml). The maximum inhibition rate was (72.4±3.1)% at 40 μg/ml and 72 h. AO/EB staining and flow cytometry showed that with the increase of the concentration of NCTD, apoptosis rate was increased significantly. Transmission electron microscope found significant morphological change of apoptosis; Western blot results showed that the protein expression of stat-3, survivin and Mcl-1 was significantly reduced, whereas the expression of bax was significantly increased. **Conclusion** NCTD can inhibit the growth of colon cancer cells LS-174T and promote its apoptosis. The mechanism maybe through inhibiting stat3.

Key words: Norcantharidin; AO/EB; AnnexinV/PI; Survivin; stat3

摘要:目的 探讨去甲斑蝥素(NCTD)诱导结肠癌LS-174T细胞的凋亡效应及其可能分子机制。 **方法** 应用MTT法检测NCTD对细胞生长的抑制作用, 通过AO/EB染色、透射电子显微镜观察细胞形态及超微结构的变化, AnnexinV/PI染色检测细胞凋亡率, Western blot检测stat3、survivin、Mcl-1、bax蛋白的表达情况。 **结果** 去甲斑蝥素对结肠癌LS-174T细胞具有显著的生长抑制作用, 并呈时间—剂量依赖性;40 μg/ml作用72 h时达到最大抑制率(72.4±3.1)%; AO/EB染色及流式细胞术显示, 随着NCTD浓度的增加, 细胞凋亡率明显增加; 透射电子显微镜观察发现, 结肠癌LS-174T细胞出现明显凋亡超微结构变化; Western blot结果显示, stat3、survivin、Mcl-1表达明显下降, bax表达明显上升。 **结论** 去甲斑蝥素可以抑制结肠癌LS-174T细胞的生长并促进其凋亡, 机制可能是通过抑制stat3途径实现的。

关键词: 去甲斑蝥素; AO/EB; AnnexinV/PI; Survivin; stat3

中图分类号: R735.3⁺5 **文献标识码:** A

0 引言

去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)是从我国传统抗肿瘤中药斑蝥中提取的斑蝥素的衍生物, 由于其特殊的升白细胞作用, 近年来被广泛应用于临床对各种肿瘤的治疗和术后的化疗中, 同时大量的体外实验也证实了去甲斑蝥素有抑制肝癌、乳腺癌、胆管癌^[1-3]等肿瘤细胞生长, 促进肿瘤

收稿日期: 2013-05-28; 修回日期: 2013-09-28

作者单位: 1. 050000 石家庄, 河北医科大学第二附属医院肛肠外科, 2. 肝胆外科; 3. 河北省中医院脾胃病科; 4. 河北医科大学第二附属医院微创外科

通信作者: 闫庆辉, E-mail: YQH3868@163.com

作者简介: 张国建(1968-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事胃肠肿瘤的临床及实验研究; 李猛(1986-), 男, 硕士在读, 主要从事肛肠外科及胃肠肿瘤的临床及研究工作(*: 并列第一作者)

细胞凋亡的作用。但当前对结肠癌细胞的体外研究报道较少,且其潜在的抑癌机制也有待研究。STAT3通路的持续活化可导致细胞的异常增生,抑制细胞凋亡,促使细胞向恶性转化,因此被公认为是一种癌基因^[4-6],同时大量研究表明在结肠癌中存在JAK3和STAT3持续高表达,STAT3的持续活化不仅促进结肠肿瘤的生长,并且促进肿瘤细胞的扩散^[7-9]。近年来对NCTD抗肿瘤作用的研究证实:NCTD可以通过调控细胞周期、诱导细胞凋亡、抗肿瘤血管及淋巴管形成从而阻止肿瘤的转移来实现其抗肿瘤作用^[10]。其中大量研究证实了去甲斑蝥素可以通过线粒体通路激活caspase系统引起肿瘤细胞的凋亡^[11-12],同时也有研究证实NCTD可以通过分别激活JNK激酶依赖性通路、TRAIL/DR5信号转导通路以及TR3依赖性通路来抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡^[13-15],但对于JAK-STAT通路研究报道较少。

本研究旨在探讨去甲斑蝥素对体外结肠癌LS-174T细胞的生长抑制作用,同时研究去甲斑蝥素作用下STAT3及其下游相关抗凋亡蛋白的表达,从而探讨去甲斑蝥素可能的促凋亡机制,为临床的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

去甲斑蝥素和DMSO购自美国Sigma公司;RPMI1640购自美国Gibco公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)购自Biosharp公司,吖啶荧光染料购自罗莱宝科技有限公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,兔抗人bax、stat3、Mcl-1、survivin多克隆抗体购自美国Bioworld公司,兔抗人 β -actin单克隆抗体购自美国Abcam公司,AnnexinV凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物试剂有限公司。

1.2 细胞系及细胞培养

人结肠癌LS-174T细胞购自中国科学院上海生命研究所,以含10%胎牛血清、100 u/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的RPMI1640培养液于温度37 $^{\circ}$ C、5%CO₂温箱中培养,待细胞贴壁,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 MTT法检测去甲斑蝥素对LS-174T细胞的生长抑制作用

取生长对数期的LS-174T细胞,将其消化成单细胞悬液,调整细胞终浓度为 1×10^5 /ml,以每孔200 μ l接种于96孔培养板中,培养24 h,待细胞贴壁后,弃上清液,分别加入质量浓度为5、10、

20和40 μ g/ml的去甲斑蝥素培养,同时设空白组(DMSO溶剂对照组)和阴性对照组(不加药物组),每个浓度设6个复孔。加药作用24、48、72 h,每孔加入20 μ l MTT(5 mg/ml),于培养箱中继续培养4 h,弃上清液,每孔加入200 μ l DMSO,充分振荡,使蓝紫色颗粒完全溶解。Ascent酶标仪检测OD₄₉₀值,计算细胞生长抑制率IR=(1-实验组OD值/对照组OD值) \times 100%,绘制细胞生长曲线。

1.4 荧光显微镜下细胞形态学观察

将对数生长期的LS-174T细胞消化,收集并调整细胞至 1×10^5 个/毫升,接种于6孔板中进行爬片,培养24 h待细胞贴壁生长后,弃去培养液,分别加入质量浓度为10、40 μ g/ml的去甲斑蝥素,同时设阴性对照组,培养箱中继续培养24 h后,弃上清液,PBS洗涤,4%多聚甲醛固定10 min,滴加AO/EB等体积混合染料,迅速置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.5 透射电子显微镜观察细胞超微结构的变化

收集0、10、40 μ g/ml去甲斑蝥素作用24 h后的结肠癌LS-174T细胞以2 000 r/min,离心10 min,小心吸尽上清液,沿管壁加入2.5%的戊二醛,4 $^{\circ}$ C保存,之后加入1%的锇酸4 $^{\circ}$ C固定2 h,用梯度丙酮脱水,用Epon 618纯化树脂浸透,包埋,烤箱中聚合后,用莱卡(Leica)超薄切片机制成切片,经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后,用透射电子显微镜观察及拍照。

1.6 流式细胞术AnnexinV-FITC/PI染色法

收集阴性对照组细胞和药物组(5、10、20、40 μ g/ml)作用24 h后细胞,于室温2 000 r/min,离心10 min,收集细胞,用预冷PBS重悬细胞,2 000 r/min离心10 min,洗涤细胞,加入300 μ l Binding Buffer悬浮,加入5 μ l AnnexinV-FITC混匀后,避光,室温孵育15 min,上机前5 min加入5 μ l PI,补加200 μ l的1 \times Binding Buffer,上流式细胞仪检测。

1.7 Western blot法检测 stat3、survivin、Mcl-1、bax的蛋白表达

收集对照组和药物组(5、10、20、40 μ g/ml)作用24 h后细胞,PBS洗涤两遍,分别加入300 μ l 蛋白裂解液,冰上作用1 h,12 000 r/min,离心10 min,取上清液,样品置于-80 $^{\circ}$ C保存,Bradford法测定蛋白质浓度,每个样品孔加入50 μ g蛋白,进行12%SDS-PAGE分离蛋白,将蛋白转移到PVDF膜上,1%BSA 37 $^{\circ}$ C封闭1 h,加入1:500稀释的survivin、stat3、Mcl-1和bax多克隆抗体,室温

振荡5 h, 洗膜后, 荧光二抗 (抗兔IgG) 避光孵育1 h, 洗膜, 发光。

1.8 统计学方法

应用SPSS13.0软件进行统计学分析, 检验数据用单因素方差分析和t检验, 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

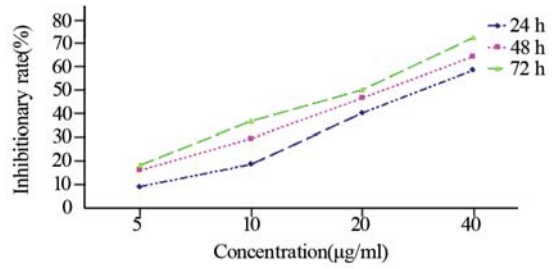
2 结果

2.1 去甲斑蝥素对结肠癌LS-174T细胞的抑制作用

MTT结果表明: 药物作用组NCTD (5、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$) 作用24 h后, 抑制率分别为(9.04 ± 2.4)%、(18.5 ± 3.5)%、(40.1 ± 5.8)%、(58.2 ± 2.7)%; 作用72 h后, 抑制率分别为(18.14 ± 7.4)%、(36.7 ± 4.3)%、(49.9 ± 3.6)%、(72.4 ± 3.1)% ($n=3, \bar{x} \pm s$)。最大抑制率在40 $\mu\text{g/ml}$ 作用72 h出现, 见图1。去甲斑蝥素对结肠癌LS-174T细胞有明显的生长抑制作用, 并且呈时间-剂量依赖性。

2.2 AO/EB 观察细胞形态学变化

正常组细胞呈均一绿染; 10 $\mu\text{g/ml}$ 药物组细胞体积减小, 胞质减少, 细胞核固缩, 染色质浓集, 凋亡细胞增加; 40 $\mu\text{g/ml}$ 药物组可见细胞核碎裂以及凋亡小体, 出现了典型的“鬼影”细胞, 见图2。随着药物浓度的增加凋亡率明显增加。



Inhibitory effect of NCTD on the growth of human colon carcinoma cells LS-174T. The cells were cultured for 24, 48 and 72 h at different concentrations of NCTD ($n=3, \bar{x} \pm s$)

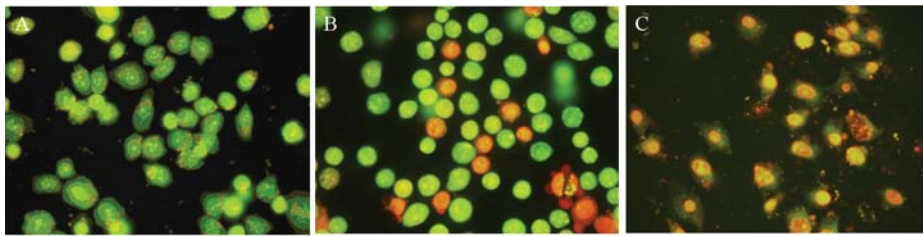
图1 去甲斑蝥素对结肠癌LS-174T细胞生长的抑制作用
Figure1 Inhibitory effect of NCTD on cell proliferation of the human colon carcinoma cells LS-174T

2.3 透射电子显微镜观察细胞超微结构的变化

阴性对照组细胞的细胞核大、双核且各有一个大而明显的核仁, 细胞表面有些细长突起, 10 $\mu\text{g/ml}$ 去甲斑蝥素作用24 h后, 细胞微绒毛减少, 核体积缩小, 核固缩, 电子密度增加。40 $\mu\text{g/ml}$ 去甲斑蝥素作用24 h后, 核膜破裂, 核染色质外排到细胞质中, 见图3。

2.4 流式AnnexinV-FITC/PI染色法分析细胞凋亡率

流式细胞仪AnnexinV-FITC/PI染色法检测药物

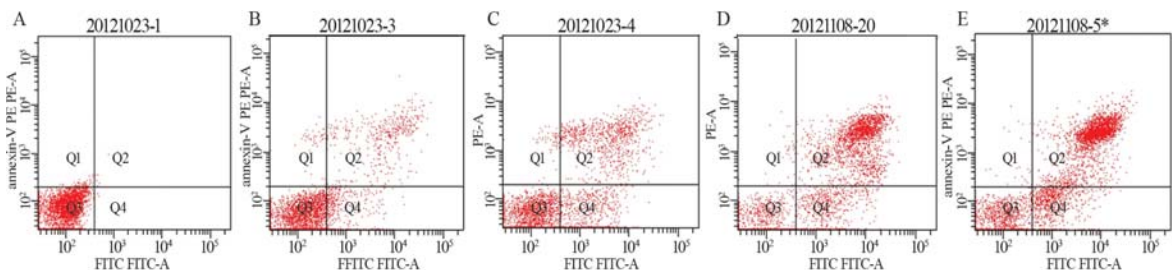


A: control group($\times 400$); B: 10 $\mu\text{g/ml}$ ($\times 400$); C: 40 $\mu\text{g/ml}$ ($\times 400$)

Human colon carcinoma cells LS-174T treated with NCTD for 24 h were stained by AO/EB showing morphological characteristics; Living cells: nuclear chromatin were green(AOhigh-EBlow); Dead cells: nuclear chromatin were orange(AOlow-EBhigh); Early apoptosis cells: nuclear chromatin were green and condensation; (AOlow-EBlow) secondary necrosis cells: nuclear chromatin were orange and condensation(AOlow-EBhigh)

图2 AO/EB染色观察结肠癌LS-174T细胞形态学的变化

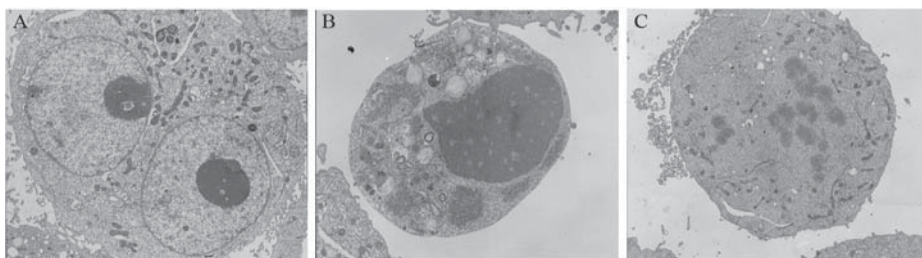
Figure2 Morphology of human colon carcinoma cells LS-174T was detected by acridine orange/ethidium bromide staining



A: control group; B-E: LS-174T cells were treated at various doses of NCTD(5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h

图4 AnnexinV/PI法检测NCTD诱导LS-174T细胞的凋亡

Figure4 Effects of NCTD on apoptosis of the human colon carcinoma cells LS-174T detected by AnnexinV/PI staining methods



A:control group (×4 000);B:human colon carcinoma LS-174T cells treated with 10 µg/ml norcantharidin for 24 h (×3 500); C: human colon carcinoma LS-174T cells treated with 40 µg/ml norcantharidin for 24 h (×6 000)

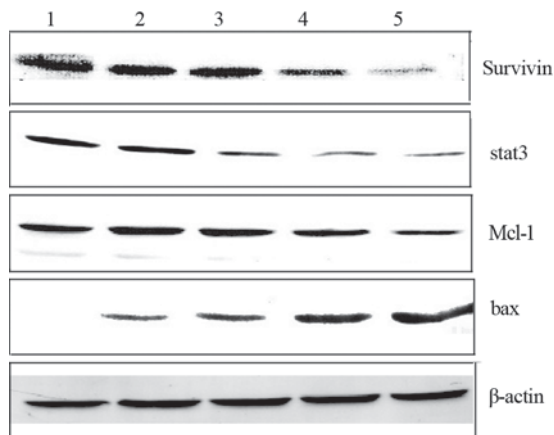
图3 透射电子显微镜下观察去甲斑蝥素对结肠癌LS-174T细胞凋亡的影响

Figure3 Effects of NCTD on apoptosis of human colon carcinoma cells LS-174T observed under transmission electron

组和阴性对照组凋亡率，结果显示与阴性对照组相比不同药物浓度（5、10、20、40 µg/ml）NCTD作用24 h后，细胞凋亡率明显增加，且呈剂量依赖性，各药物组之间凋亡率差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），见图4，表1。

2.5 Western blot方法检测stat3、survivin、Mcl-1和bax蛋白的表达

阴性对照组和药物组干预组（NCTD 5、10、20、40 µg/ml）作用24 h后，检测stat3、survivin、Mcl-1、bax蛋白表达情况。结果显示：stat3、survivin、Mcl-1蛋白表达减少,bax蛋白表达增加,且随药物浓度的增加表达也增加，呈明显的剂量依赖关系，见图5。



lane 1:control lane;lanes 2-5: 5,10,20,40 µg/ml

图5 Western blot测定去甲斑蝥素对survivin、stat3、Mcl-1、bax表达的影响

Figure5 Effects of NCTD on the expression of survivin , stat3, Mcl-1 and bax detected by Western blot

3 讨论

随着人民生活水平的提高和饮食结构的改变，结肠癌在我国的发病率呈现出逐年上升趋势，当前对于结肠癌的治疗主要以手术为主辅以放化疗，但由于结肠癌的发病比较隐匿，出现症状时往往已处于中晚期，错过了手术的最佳时期，而单纯放化疗远期生存率并不理想，并且复发率及转移率较高，尤其是晚期结肠癌生存率极低，于是从传统中医药理论出发，用中药及其提取成分治疗肿瘤为人们提供了新的治疗思路，并且越来越多地受到国内外医学专家的重视。本实

验通过去甲斑蝥素(NCTD)对体外结肠癌LS-174T细胞的作用，证实了去甲斑蝥素对结肠癌细胞存在明显的生长抑制作用，并且呈时间-剂量相关性。进一步应用AO/EB染色以及AnnexinV/PI法检测LS-174T细胞凋亡百分率，结果显示，去甲斑蝥素作用下早期凋亡，晚期凋亡细胞数量随着药物浓度的增加明显增加，提示去甲斑蝥素通过增加凋亡来抑制结肠癌LS-174T细胞生长。同时应用透射电子显微镜观察细胞超微结构发现，出现了细胞表面微绒毛减少，胞核固缩、细胞核膜破裂，

表1 AnnexinV/PI法检测NCTD诱导LS-174T细胞凋亡百分率 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table1 Apoptosis rate of the human colon carcinoma LS-174T cells induced by NCTD was detected by AnnexinV /PI staining methods

Groups	AnnexinV /PI (%)		
	Early apoptosis	Secondary necrosis	Total apoptosis
Control	0.5±0.03	1.2±0.02	1.7±0.12
5 µg/ml	9.4±2.46	6.0±3.45	15.4±4.34**
10 µg/ml	13.7±5.34	18.9±4.64	32.6±3.96**
20 µg/ml	8.2±6.53	41.1±5.54	49.3±5.63*
40 µg/ml	8.8±8.43	56.5±10.34	65.3±9.64*

Notes: *: $P<0.05$ vs.control; **: $P<0.01$ vs.control;Early apoptosis :Annexin V +/PI -;Secondary necrosis :Annexin V +/PI +;

Normal cell:Annexin V +/PI -; Mechanical damage :Annexin V -/PI +

染色质外排等典型的凋亡形态学改变,更加证实了去甲斑蝥素对结肠癌细胞的促凋亡作用。

JAK-STAT3 信号转导通路,参与肿瘤的发生、发展,在许多人类肿瘤中被激活,成为目前肿瘤信号转导通路研究的热点。JAK-STAT 信号通路由JAK酪氨酸激酶家族和STAT信号转导和转录激活因子家族构成,STAT信号转导通路是表皮生长因子(EGF)、JAK和IL-6等多个致癌性酪氨酸激酶信号通道汇聚的焦点^[16],STAT3作为重要的信号转导分子,通过激活靶基因而诱导某些关键产物的表达来影响肿瘤的发生;重要的靶基因产物包括影响细胞凋亡的Bcl-2家族成员。本实验应用Western blot对NCTD作用结肠癌LS-174T细胞后相关蛋白的表达进行检测,发现NCTD可以明显抑制STAT3蛋白的表达,且呈剂量相关性,推测NCTD促进细胞凋亡的机制可能与抑制JAK-STAT3的信号通路活化有关。

Bcl-2家族包括抑制凋亡和促进凋亡两大类,前者包括Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1等,后者包括Bax、Bak、Bcl-xS等^[17],髓样细胞白血病-1(Myeloid Cell Leuke-lia-1, MCL-1)基因属于BCL-2抗凋亡家族成员之一, Mcl-1基因编码的蛋白主要位于细胞内膜系统,尤其是线粒体膜,通过阻止Smac、细胞色素C、AIF的释放来抑制细胞的凋亡,该基因的表达异常与肿瘤的发生发展关系密切,而目前研究表明JAK-STAT3 信号转导途径是调节Mcl-1表达的主要途径^[18-19]。既然NCTD可以抑制JAK-STAT3的信号通路的活化,那么, Mcl-1的表达是否也发生相应改变呢? Western blot结果显示, NCTD呈剂量依赖性地抑制Mcl-1的表达,初步证明NCTD促进细胞凋亡的机制可能与抑制JAK-STAT3的信号通路、减少Mcl-1表达有关。

Bax为Bcl-2促凋亡家族成员之一,位于细胞质,当细胞DNA受损时,可与Bcl-2形成同源或者异源二聚体,拮抗bcl-2蛋白的抗凋亡功能,通过激活线粒体凋亡通路,引起一系列caspase家族的级联反应,最终导致细胞凋亡的发生^[20-21]。与我们预想一致的是NCTD呈剂量依赖性促进Bax的表达,上述结果进一步说明NCTD诱导细胞凋亡的机制与激活促凋亡基因和抑制抗凋亡基因的表达有关。

Survivin为迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子(inhibitor of apoptosis, IAP),在正常分化成熟的组织中几乎不表达,而选择性地表达于多种恶性肿瘤组织。它除了具有促进细胞的抗凋亡

和向恶性转化作用外,还有促细胞增殖、血管生成和肿瘤转移的作用^[22],虽然不属于bcl-2家族,但研究表明survivin上具有STAT3结合位点,通过抑制STAT3的表达可以减少survivin蛋白的表达,从而促进肿瘤细胞的凋亡^[23-25]。本实验也发现, NCTD可以通过抑制STAT3信号通路减少survivin的表达,与以往报道相一致。

综上所述,本实验应用Western blot对NCTD作用结肠癌LS-174T细胞后相关蛋白的表达进行检测,发现NCTD可以明显抑制STAT3蛋白的表达,且呈剂量相关性,进一步检测其下游调控蛋白survivin、Mcl-1的表达,发现显示随着药物浓度的增加它们的表达也随之减少,而促凋亡蛋白Bax表达反而增加,这些结果表明去甲斑蝥素可能直接或者间接参与了对JAK-STAT3凋亡通路的调节,通过减少STAT3的磷酸化激活,并抑制其与下游抗凋亡基因启动子结合,使相关凋亡蛋白的表达减少,同时激活线粒体等凋亡通路,从而诱发结肠癌细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] Fan YZ, Fu JY, Zhao ZM, *et al.* Inhibitory effect of norcantharidin on the growth of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells *in vitro*[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int ,2007,6(1):72-80.
- [2] Fan YZ, Fu JY, Zhao ZM, *et al.* The *in vitro* effect of norcantharidin on proliferation and invasion of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells and its mechanism[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2004,26(5):271-4.[范跃祖, 傅锦业, 赵泽明, 等. 去甲斑蝥素对人胆囊癌GBC-SD细胞系增殖及侵袭的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2004,26(5):271-4.]
- [3] Chang C, Zhu Y, Tang X, *et al.* The anti-proliferative effects of norcantharidin on human HepG2 cells in cell culture[J]. Mol Biol Rep, 2011,38(1):163-9.
- [4] Chen CL, Cen L, Kohout J, *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 activation is associated with bladder cancer cell growth and survival[J]. Mol Cancer, 2008,7:78.
- [5] Fossey SL, Liao AT, McCleese JK, *et al.* Characterization of STAT3 activation and expression in canine and human osteosarcoma[J]. BMC Cancer, 2009,9:81.
- [6] de Araújo VC, Furuse C, Cury PR, *et al.* STAT3 expression in salivary gland tumours[J]. Oral Oncol, 2008,44(5):439-45.
- [7] Lin Q, Lai R, Chirieac LR, *et al.* Constitutive activation of JAK3/STAT3 in colon carcinoma tumors and cell lines: inhibition of JAK3/STAT3 signaling induces apoptosis and cell cycle arrest of colon carcinoma cells.[J]. Am J Pathol, 2005,167(4):969-80.
- [8] Corvinus FM, Orth C, Moriggi R, *et al.* Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth[J]. Neoplasia, 2005,7(6):545-55.
- [9] Xiong H, Zhang ZG, Tian XQ, *et al.* Inhibition of JAK1, 2/STAT3

- signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells[J]. *Neoplasia*,2008,10(3): 287-97.
- [10] Yeh CB, Hsieh MJ, Hsieh YH, *et al.* Antimetastatic effects of norcantharidin on hepatocellular carcinoma by transcriptional inhibition of MMP-9 through modulation of NF- κ B activity[J]. *PLoS One*,2012,7(2):e31055.
- [11] An WW, Gong XF, Wang MW, *et al.* Norcantharidin induces apoptosis in HeLa cells through caspase, MAPK, and mitochondrial pathways[J]. *Acta Pharmacol Sin*,2004,25(11):1502-8.
- [12] Chang C, Zhu YQ, Mei JJ, *et al.* Involvement of mitochondrial pathway in NCTD-induced cytotoxicity in human hepG2 cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2010,29:145.
- [13] Yan-Nian Chen, Chi-Chih Cheng, Jung-Chou Chen, *et al.* Norcantharidin-induced apoptosis is via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase signaling pathways in human hepatoma HepG2 cells[J]. *Br J Pharmacol*,2003,140(3): 461-70.
- [14] Liu S, Yu H, Kumar SM, *et al.* Norcantharidin induces melanoma cell apoptosis through activation of TR3 dependent pathway[J]. *Cancer Biol Ther*,2011,12(11):1005-14.
- [15] Yeh CH, Yang YY, Huang YF, *et al.* Induction of apoptosis in human Hep3B hepatoma cells by norcantharidin through a p53 independent pathway via TRAIL/DR5 signal transduction[J]. *Chin J Integr Med*, 2012,18(9):676-82.
- [16] Jing N, Tweardy DJ, *et al.* Targeting Stat3 in cancer therapy[J]. *Anticancer Drugs*, 2005,16 (6):601-7.
- [17] Cory S, Huang DC, Adams JM, *et al.* The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. *Oncogene*,2003,22(53): 8590-607.
- [18] Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, *et al.* Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression[J]. *J Clin Invest*, 2001,107(3):351-62.
- [19] Zhang B, Potyagaylo V, Fenton RG, *et al.* IL-6-independent expression of Mcl-1 in human multiple myeloma[J]. *Oncogene*,2003,22(12): 1848-59.
- [20] Chipuk JE, Maurer U, Green DR, *et al.* Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription[J]. *Cancer Cell*,2003,4(5):371-81.
- [21] Peng LT, Xu X. Effect of Fas, bcl-2 and caspase8 on Norcantharidin Induced Esophageal Cancer Cell Line Eca-109 Apoptosis and Molecular Mechanism[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*,2010,37(4): 398-401. [彭林涛, 许欣. Fas、bcl-2和caspase8在去甲基斑蝥素诱导食管癌细胞凋亡中的作用及机制[J]. *肿瘤防治研究*,2010,37(4):398-401.]
- [22] Wu XY, Fu ZX, Wang XH, *et al.* Effect of hypoxia-inducible factor 1- α on Survivin in colorectal cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2010,3(3):409-15.
- [23] Scheper MA, Nikitakis NG, Sauk JJ, *et al.* Survivin is a downstream target and effector of sulindac-sensitive oncogenic Stat3 signalling in head and neck cancer[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2007,36(7):632-9.
- [24] Kanda N, Seno H, Konda Y, *et al.* STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells[J]. *Oncogene*, 2004,23(28):4921-9.
- [25] Aoki Y, Feldman GM, Tosato G, *et al.* Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma[J]. *Blood*, 2003,101(4):1535-42.

[编辑: 黄园玲; 校对: 安 凤]