

吲哚-2,3-二酮对SH-SY5Y细胞增殖与迁移的影响及其机制

仇碧茹¹ 侯琳¹ 张丽² 牛婷婷³ 宋军莹¹

(1 青岛大学基础医学院生物化学与分子生物学系,山东 青岛 266071; 2 青岛大学药学院; 3 青岛大学附属医院乳腺外科)

[摘要] 目的 研究吲哚-2,3-二酮(ISA)对SH-SY5Y细胞增殖与迁移的影响及其机制。方法 采用CCK-8实验检测ISA对SH-SY5Y细胞活力的影响,并计算其半致死浓度(IC_{50} 值)作为后续实验中浓度设定的参考值。以 IC_{50} 值为依据,向SH-SY5Y细胞中分别加入总浓度为0、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的ISA(A、B、C、D组),采用平板克隆实验、划痕实验、细胞凋亡率检测及PI染色流式细胞仪(FCM)分析实验检测ISA对各组SH-SY5Y细胞增殖、迁移、凋亡及细胞周期的影响。采用Western blot实验检测各组SH-SY5Y细胞中Bax、Bcl2等蛋白的相对表达量。结果 CCK-8实验结果显示,随着ISA浓度的增加,SH-SY5Y细胞活力明显下降($F=1632.62, P<0.05$);平板克隆结果显示,随着ISA药物浓度的增加,细胞的集落形成能力被抑制($F=1038.21, P<0.05$);划痕实验结果显示,细胞的迁移能力随着ISA浓度的增加而明显下降($F=147.86, P<0.05$);流式细胞仪检测结果显示,随着ISA浓度增加,细胞的凋亡率明显增高($F=557.71, P<0.05$);PI染色法结果显示,随着ISA浓度的增加,细胞的G₁周期构成比明显增高($F=632.38, P<0.05$);Western blot实验结果显示,随着ISA浓度的增加p-JAK2、p-STAT3及Bcl2蛋白的表达量明显下降($F=286.56 \sim 541.13, P<0.05$),而Bax的蛋白表达水平则明显升高($F=464.50, P<0.05$)。结论 ISA可以有效地抑制神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞的增殖以及迁移,其抑制作用可能是通过调节JAK2/STAT3通路实现的。

[关键词] 神经母细胞瘤;靛红;Janus激酶2;STAT3转录因子;信号传导;细胞增殖;细胞运动

[中图分类号] R730.264

[文献标志码] A

EFFECTS OF INDOLE-2, 3-DIONE ON THE PROLIFERATION AND MIGRATION OF SH-SY5Y CELLS AND UNDERLYING MECHANISMS QIU Biru, HOU Lin, ZHANG Li, NIU Tingting, SONG Junying (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effects of indole-2,3-dione (ISA) on the proliferation and migration of SH-SY5Y cells and the underlying mechanisms. **Methods** CCK-8 assay was used to assess the effect of ISA on the viability of SH-SY5Y cells, and half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated and used as the reference value of concentration setting in subsequent experiments. On the basis of IC_{50} , SH-SY5Y cells were added with ISA at the final concentrations of 0, 50, 100, and 200 $\mu\text{mol/L}$ (groups A, B, C, D, respectively). The effects of ISA on the proliferation, migration, apoptosis, and cell cycle of SH-SY5Y cells were determined by plate cloning, scratch assay, cell apoptosis rate detection, and PI staining flow cytometry analysis. Western blot assay was used to determine the relative expression of proteins such as Bax and Bcl2 in SH-SY5Y cells.

Results The CCK-8 assay showed that the activity of SH-SY5Y cells decreased significantly with the increase in ISA concentration ($F=1632.62, P<0.05$). Plate cloning showed that the colony formation ability of the cells was inhibited with the increase in ISA concentration ($F=1038.21, P<0.05$). Scratch test showed that the migration ability of cells decreased significantly with the increase in ISA concentration ($F=147.86, P<0.05$). Flow cytometry showed that with the increase in ISA concentration, the apoptosis rate of cells increased significantly ($F=557.71, P<0.05$). PI staining showed that with the increase in ISA concentration, the proportion of cells in the G₁ phase increased significantly ($F=632.38, P<0.05$). Western blot showed that with the increase in ISA concentration, the expression of p-JAK2, p-STAT3, and Bcl2 decreased significantly ($F=286.56 \sim 541.13, P<0.05$), while the expression of Bax increased significantly ($F=464.50, P<0.05$). **Conclusion** ISA can effectively inhibit the proliferation and migration of neuroblastoma SH-SY5Y cells, which may be achieved by regulating the JAK2/STAT3 pathway.

[KEY WORDS] Neuroblastoma; Isatin; Janus kinase 2; STAT3 transcription factor; Signal transduction; Cell proliferation; Cell movement

神经母细胞瘤起源于交感神经系统^[1-2],常用的治疗手段有化疗、手术切除、高剂量化疗联合自体干

细胞挽救(ASCR)等^[3]。然而临床常用的化学合成药物具有毒副作用大、治疗效果不佳且伴有明显的骨髓抑制等缺点^[4],从而限制了这些化学合成药物的临床应用。

吲哚-2,3-二酮(ISA)是天然存在于自然界的吲

[收稿日期] 2023-02-19; [修订日期] 2023-04-15

[基金项目] 山东省重点研发项目(2019GSF107025;20210202-

1147;2021Z196)

[通讯作者] 侯琳,Email:qingyi001@126.com

哚类化合物,是我国独创Ⅰ类天然抗癌新药靛玉红的单体结构,具有抗病毒、抗肿瘤等作用^[5-7]。Janus 激酶(JAK)属于酪氨酸激酶家族,由 TYK2、JAK1、JAK2、JAK3 4 个成员组成。JAK2 作为多种生长因子和细胞因子激活信号通路的调节器,在多种细胞类型中高表达^[8]。研究发现,激活 JAK2/STAT3 信号通路可促进多种人类肿瘤如胶质母细胞瘤、肺癌、肝癌等的发生和进展^[9-10],阻断该通路可抑制细胞增殖,并诱导肿瘤细胞的凋亡^[11-13]。本研究通过探讨 ISA 对神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞抗肿瘤的作用及机制,旨在为神经母细胞瘤的治疗提供有益的参考价值。

1 材料与方法

1.1 试剂与抗体

神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞购自中科院上海细胞库,ISA 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;GAPDH 抗体、p-JAK2 抗体、p-STAT3 抗体、Bax 抗体、Bcl2 抗体购买于英国 Abcam 公司;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自上海翌圣生物科技股份有限公司;CCK-8 试剂盒、PI 染色液、牛血清白蛋白(BCA)蛋白浓度测定试剂盒均购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

使用 DMEM 高糖培养基+体积分数 0.10 的胎牛血清+青链霉素混合溶液(100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素)配置完全培养基,然后将 SH-SY5Y 细胞养于含有完全培养基的细胞培养瓶中,并置于 37 °C、含体积分数 0.05 CO₂ 的恒温培养箱中培养,待细胞进入对数生长期后,进行后续实验。

1.3 CCK-8 实验检测 ISA 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板中,每孔 1 000~2 000 个细胞,向每孔中加入含不同浓度(0、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、800 μmol/L) ISA 的完全培养基,放入 37 °C、含体积分数 0.05 CO₂ 的培养箱中培养 48 h 后,向每个孔中加入 10 μL CCK-8 溶液继续孵育 2 h。酶标仪测量波长 450 nm 的各孔吸光度(A)值,计算不同浓度下细胞活力及半致死浓度(IC₅₀ 值)。

1.4 平板克隆实验检测 ISA 对 SH-SY5Y 细胞克隆形成能力的影响

将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔板中,每孔约 500 个细胞,置于培养箱中培养 24 h 后,

分别加入含有 0、50、100、200 μmol/L ISA(A~D 组),培养箱中培养 1~2 周,孔中可见克隆形成时终止培养。甲醇固定细胞 15 min,弃固定液,结晶紫染色细胞 10 min,洗去染色液,自然风干。肉眼计数克隆数,计算克隆形成率。

1.5 划痕实验检测 ISA 对 SH-SY5Y 细胞迁移能力的影响

将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞接种于内含完全培养基的 6 孔板中,每孔约 50 000 个细胞,当细胞融合度约为 90% 时,用 200 μL 枪头垂直于培养板进行划痕。用 PBS 清洗细胞 3 次后,每孔加入 2 mL 无血清培养基,并分别加入含有 0、50、100 及 200 μmol/L ISA(A~D 组)无血清培养基继续培养。于第 0、12、24 和 48 小时时显微镜下拍照,计算划痕面积。

1.6 ISA 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞,接种于 6 孔板中,每孔约 10 000 个细胞,分别加入含有 0、50、100、200 μmol/L ISA(A~D 组),培养 48 h 后。按 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书的操作要求,用流式细胞仪进行细胞凋亡的检测,并计算细胞凋亡率。

1.7 ISA 对 SH-SY5Y 细胞周期的影响

将处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞培养于细胞培养瓶中,分别加入含有 0、50、100、200 μmol/L ISA(A~D 组)的完全培养基,置于培养箱中培养 48 h 后,按照 PI 染色试剂盒说明书对细胞进行处理,用流式细胞仪进行细胞周期的检测,计算 G₁ 期细胞构成比。

1.8 Western blot 实验检测 ISA 对 SH-SY5Y 细胞中 p-JAK2、p-STAT3、Bcl2、Bax 蛋白相对表达量的影响

收集终浓度为 0、50、100、200 μmol/L ISA 处理 48 h 后的 SH-SY5Y 细胞(A~D 组),RIPA 裂解液处理后提取总蛋白,BCA 法测蛋白浓度后进行电泳,PVDF 转膜后用封闭液室温封闭 2 h,TBST 清洗 3 次,一抗孵育过夜,TBST 清洗 3 次,二抗孵育 1 h。按 ECL 发光液说明书孵育 PVDF 膜,成像仪显影并拍照。以 GAPDH 的条带结果为内参照,将目的蛋白与内参的条带进行比较,以计算目的蛋白的相对表达量。

1.9 统计学方法

采用 SPSS Statistics 22 进行统计学分析。以上实验每组细胞均设置 3 个复孔,重复测量 3 次,结

果取均值。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ISA 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响及其 IC_{50} 值

CCK-8 实验结果显示, 以终浓度为 0、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、800 $\mu\text{mol/L}$ 的 ISA 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 以后, SH-SY5Y 细胞的细胞活力分别为(100.00 ± 0.73)%、(97.56 ± 0.58)%、(95.10 ± 0.55)%、(90.00 ± 1.04)%、(86.62 ± 0.39)%、(84.29 ± 0.77)%、(80.26 ± 0.93)%、(69.97 ± 0.91)%、(62.71 ± 1.04)%、(57.48 ± 1.04)%、(40.33 ± 1.04)%、(22.68 ± 0.79)%, 随着 ISA 浓度的递增, SH-SY5Y 细胞的活力逐渐下降($F = 1632.62, P < 0.05$)。计算得到 ISA 作用 SH-SY5Y 细胞 48 h 后的 IC_{50} 值为 300 $\mu\text{mol/L}$, 小于 IC_{50} 值的浓度对细胞没有毒性, 故后续的实验选用的 ISA 浓度为 0、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 各组 SH-SY5Y 细胞集落形成能力的比较

平板克隆实验的结果显示, A~D 组的克隆形成率分别为(100.00 ± 1.99)%、(79.88 ± 1.32)%、(52.82 ± 1.09)%、(25.75 ± 1.08)%, 随着 ISA 浓度的增加, SH-SY5Y 细胞的集落形成能力逐渐下降($F = 1038.21, P < 0.05$), 各组间两两比较差异均具有显著性($t = 11.91 \sim 46.43, P < 0.05$)。

2.3 各组 SH-SY5Y 细胞迁移能力的比较

重复测量设计的方差分析结果显示, 组别、时间及组别和时间的交互作用对 SH-SY5Y 细胞迁移能力均具有明显影响($F_{\text{组别}} = 379.00, F_{\text{时间}} = 291.00, F_{\text{组别} * \text{时间}} = 2.84, P < 0.05$); 单独效应分析结果显示, 随着时间的延长, A~D 组 SH-SY5Y 细胞的迁移能力逐渐增强($F = 94.83 \sim 153.77, P < 0.05$), 同一组内不同时间点两两比较差异均具有显著性($t = 5.90 \sim 23.14, P < 0.05$), 不同时间点各组之间整体比较差异有显著性($F = 39.87 \sim 222.00, P < 0.05$), 各组之间两两比较差异也具有显著意义($t = 3.57 \sim 34.28, P < 0.05$)。见表 1。

2.4 各组 SH-SY5Y 细胞凋亡率的比较

检测结果显示, A~D 组的凋亡率分别为(4.29 ± 0.17)%、(6.16 ± 0.21)%、(8.74 ± 0.34)%、(17.01 ± 0.51)%, 随着 ISA 浓度的升高, 细胞的凋亡率逐渐升高($F = 557.71, P < 0.05$), 各组间两两比较差异

均具有显著性($t = 9.06 \sim 33.41, P < 0.05$)。

2.5 各组 SH-SY5Y 细胞中 G₁ 期细胞构成比比较

检测结果显示, A~D 组的 G₁ 期细胞构成分别为(35.33 ± 1.17)%、(42.59 ± 0.13)%、(54.04 ± 0.21)%、(58.09 ± 0.13)%, 随着 ISA 浓度的升高, SH-SY5Y 细胞 G₁ 期细胞构成比显著性增高($F = 632.38, P < 0.05$), 各组间两两比较差异具有显著性($t = 8.67 \sim 123.68, P < 0.05$)。

2.6 各组 SH-SY5Y 细胞中 Bax、Bcl2 及 p-JAK2、p-STAT3 蛋白相对表达量比较

实验结果显示, A~D 组 Bax 的蛋白相对表达量随 ISA 浓度的增高明显升高($F = 464.50, P < 0.05$), 而 p-JAK2、p-STAT3、Bcl2 蛋白相对表达量随 ISA 浓度的升高明显降低($F = 286.56 \sim 541.13, P < 0.05$), 各组间两两比较, 上述 4 种蛋白的表达差异均具有显著性($t = 5.75 \sim 50.46, P < 0.05$)。见表 2。

表 1 各组 SH-SY5Y 细胞迁移率比较($\chi/\%, n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	第 12 小时	第 24 小时	第 48 小时
A 组	60.41 ± 1.93	70.33 ± 0.64	86.55 ± 0.75
B 组	48.89 ± 2.39	61.56 ± 1.82	68.66 ± 1.08
C 组	37.56 ± 2.43	44.47 ± 2.75	59.11 ± 2.18
D 组	27.01 ± 1.48	35.71 ± 1.28	50.72 ± 2.51

表 2 各组 SH-SY5Y 细胞中 p-JAK2、p-STAT3、Bcl2、Bax 蛋白的相对表达量比较($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	p-JAK2	p-STAT3	Bcl2	Bax
A 组	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.05
B 组	0.69 ± 0.03	0.69 ± 0.02	0.76 ± 0.02	1.62 ± 0.12
C 组	0.51 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.51 ± 0.03	2.86 ± 0.11
D 组	0.30 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.01	4.17 ± 0.08

3 讨 论

肿瘤侵袭和转移是一个高度有序、非随机、器官选择性的过程, 涉及一系列复杂的步骤^[14]。神经母细胞瘤的相关性死亡大多数发生于淋巴结和骨骼转移^[15]。因此, 抑制癌细胞侵袭和迁移对于肿瘤的治疗至关重要^[16]。

随着细胞生物学、肿瘤基因学研究的不断深入, 寻找作用效果好、毒副作用低、特异性强的新型抗肿瘤药物已成为当今抗肿瘤药物研究的重要发展方向。近年来, 全球的目光纷纷聚集于能够直接靶向作用肿瘤细胞、对正常细胞损伤较小的天然小分子化合物类药物(如长春碱、长春新碱等)的研究。ISA 作为天然吲哚类化合物^[16], 具有多种药理学活

性,如神经保护、抗菌和抗病毒等活性^[17]。既往研究发现,ISA 还具有促进细胞凋亡和抑制细胞增殖的作用^[18-20]。

JAK2 是一种广泛表达的非受体蛋白酪氨酸激酶,可作为多种生长因子(包括白细胞介素、干扰素、生长激素、促红细胞生成素和瘦素)和细胞因子受体激活的信号通路的调节器。JAK2 可由多种细胞因子(包括生长激素、干扰素 γ)、生长因子(包括 EGF 和 PDGF)和 GPCR 配体激活,并参与细胞的增殖与迁移。

JAK2 激活 STAT3 后,被激活的 STAT3 转移到细胞核中,进一步激活各种靶基因的转录^[21-23]。STAT3 作为众多致癌信号通路的汇合点,在肿瘤形成中发挥着重要的作用。大量证据表明 STAT3 可参与细胞凋亡以及肿瘤细胞的增殖和侵袭^[1]。既往的研究表明,在神经母细胞瘤中,肿瘤细胞的迁移可能与 p-STAT3 的表达下降有关^[24]。p-STAT3 是 STAT3 的活化形式,异常的 STAT3 信号传导是肿瘤恶性进展的关键过程,并由 JAK2 诱导^[24]。

针对神经母细胞瘤增殖能力强、易转移的特性,本研究对 ISA 在神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞中的抑制作用进行了深入探究。通过 CCK-8 实验检测不同浓度 ISA 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响,结果显示随着 ISA 浓度的升高,SH-SY5Y 细胞活力逐渐下降,计算得出 ISA 作用于 SH-SY5Y 细胞 48 h 的 IC₅₀ 值为 300 $\mu\text{mol/L}$,小于 IC₅₀ 值的浓度对细胞没有毒性,因此选用 0、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 为后续实验的浓度。本研究采用平板克隆实验、划痕实验分别检测 ISA 对 SH-SY5Y 细胞克隆形成能力和迁移能力的影响,结果显示不同浓度的 ISA 处理 SH-SY5Y 细胞后,随着 ISA 浓度的增加,细胞的克隆形成率和迁移率均明显下降,这表明 ISA 显著抑制了 SH-SY5Y 细胞的克隆形成能力和迁移能力。当肿瘤细胞的凋亡机制被破坏,细胞生长不再受到限制时,肿瘤便会随之发生和发展。若能够重新激活肿瘤细胞的凋亡机制,就有望实现治疗肿瘤的目标。细胞周期在抗癌药物筛选中是一个主要的关注点,细胞生长需要经历 G₁、S、G₂ 与 M 期,细胞从 G₁ 进入 S 期为关键点,决定了细胞周期能否继续。为了探究 ISA 对 SH-SY5Y 细胞的凋亡和细胞周期的影响,本研究采用 Annexin V-FITC/PI 试剂和 PI 染色流式细胞仪分别检测 ISA 对 SH-SY5Y 细胞的凋亡和细胞周期的影响,结果显示不同浓度的 ISA 作用于 SH-SY5Y 细胞后,随着 ISA 浓度的增高,SH-

SY5Y 细胞的凋亡率明显升高,且 G₁ 期细胞构成比显著增高。Bax 和 Bcl2 同属于 Bcl2 家族,Bax 为促细胞凋亡的因子,而 Bcl2 为抗细胞凋亡因子,均为参与细胞凋亡的重要生物学因子。JAK2、STAT3 作为 JAK2/STAT3 通路的重要成员,p-JAK2 以及 p-STAT3 的表达水平变化可反映 ISA 能否通过此信号通路发挥抑制肿瘤发生与发展的作用。本研究 Western blot 实验结果表明,SH-SY5Y 细胞中的 Bax 的蛋白相对表达量随 ISA 浓度的增高明显升高,而 p-JAK2、p-STAT3 和 Bcl2 蛋白相对表达量随 ISA 浓度的升高明显下降,表明 ISA 可以促进 Bax 蛋白表达,同时抑制 p-JAK2、p-STAT3、Bcl2 蛋白的表达。

综上所述,本研究结果显示,ISA 对神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞的增殖与迁移具有显著的抑制作用,其抑制作用可能是通过 JAK2/STAT3 通路实现。ISA 有望为神经母细胞瘤的临床治疗提供新的思路,具有乐观的应用前景。

作者声明:仇碧茹、侯琳、张丽参与了研究设计;仇碧茹、牛婷婷、宋军莹参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] KHOLODENKO I V, KALINOVSKY D V, DORONIN I I, et al. Neuroblastoma origin and therapeutic targets for immunotherapy[J]. J Immunol Res, 2018, 2018:7394268.
- [2] XU P P, HOU L, JU C X, et al. Isatin inhibits the proliferation and invasion of SH-SY₅ Y neuroblastoma cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(3):2757-2762.
- [3] CHUNG C, BOTERBERG T, LUCAS J, et al. Neuroblastoma[J]. Pediatr Blood Cancer, 2021, 68:e28473.
- [4] 谈珍,张勤,盛琦,等. 神经母细胞瘤高危组患儿化学治疗后外周血细胞改变及严重感染相关因素的分析[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(3):377-380.
- [5] RAY D, PAUL B K, GUCHHAIT N. Differential binding modes of anti-cancer, anti-HIV drugs belonging to isatin family with a model transport protein: A joint refinement from spectroscopic and molecular modeling approaches[J]. J Photochem Photobiol B, 2013, 127:18-27.
- [6] HAN K L, ZHOU Y, LIU F X, et al. Design, synthesis and *in vitro* cytotoxicity evaluation of 5-(2-carboxyethenyl) isatin derivatives as anticancer agents[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(2):591-594.
- [7] KUMAR S, NAIR A S, ABDELGAWAD M A, et al. Exploration of the detailed structure-activity relationships of isatin and their isomers As monoamine oxidase inhibitors[J]. ACS Omega, 2022, 7(19):16244-16259.

- [8] VERMA A, KAMBHAMPTI S, PARMAR S, et al. Jak family of kinases in cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, 22(4):423-434.
- [9] XIONG H, ZHANG Z G, TIAN X Q, 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):287-297.
- [10] SEN M, POLLOCK N I, BLACK J, et al. JAK kinase inhibition abrogates STAT3 activation and head and neck squamous cell carcinoma tumor growth[J]. *Neoplasia*, 2015, 17(3):256-264.
- [11] JIA L F, SONG Q, ZHOU C Y, et al. Dihydroartemisinin as a putative STAT3 inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinoma by targeting Jak2/STAT3 signaling[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0147157.
- [12] 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.
- [13] CHAMBERS A F, GROOM A C, MACDONALD I C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8):563-572.
- [14] MATTHAY K K, VILLABLANCA J G, SEEGER R C, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(16):1165-1173.
- [15] MONCLAIR T, BRODEUR G M, AMBROS P F, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: An INRG Task Force report[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(2):298-303.
- [16] REN A L, SU B H, YE S Y, et al. A pharmacokinetic study
- ~~~~~
- (上接第 359 页)
- [10] WU Y Y, YANG X M, JING J, et al. Prognostic significance of atrial cardiopathy in patients with acute ischemic stroke[J]. *Eur Stroke J*, 2023, 8(1):183-190.
- [11] HOU J, SUN Y, ZHANG L B, et al. Assessing left atrial function in patients with atrial fibrillation and valvular heart disease using cardiovascular magnetic resonance imaging[J]. *Clin Cardiol*, 2022, 45(5):527-535.
- [12] ABHAYARATNA W P, SEWARD J B, APPLETON C P, et al. Left atrial size: Physiologic determinants and clinical applications[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(12):2357-2363.
- [13] KAMEL H, OKIN P M, LONGSTRETH W T Jr, et al. Atrial cardiopathy: A broadened concept of left atrial thromboembolism beyond atrial fibrillation [J]. *Future Cardiol*, 2015, 11(3):323-331.
- [14] PERLEPE K, SIRIMARCO G, STRAMBO D, et al. Left atrial diameter thresholds and new incident atrial fibrillation in embolic stroke of undetermined source[J]. *Eur J Intern Med*,
- of Isatin in Beagles' bodies[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(6):2225-2228.
- [17] GENCER N, SONMEZ F, DEMIR D, et al. Synthesis, structure-activity relationships and biological activity of new isatin derivatives as tyrosinase inhibitors[J]. *Curr Top Med Chem*, 2014, 14(12):1450-1462.
- [18] HOU L, JU C X, ZHANG J Y, et al. Antitumor effects of Isatin on human neuroblastoma cell line (SH-SY₅Y) and the related mechanism[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 589(1-3):27-31.
- [19] 祝兆怡,侯琳,鞠传霞,等. 2,3-吲哚醌对人神经母细胞瘤 SH-SY₅Y 细胞增殖影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2007, 43(2):128-131.
- [20] SONG J L, HOU L, JU C X, et al. Isatin inhibits proliferation and induces apoptosis of SH-SY₅Y neuroblastoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 702(1-3):235-241.
- [21] LIU H B, JIANG C Y, XIONG C M, et al. DEDC, a new flavonoid induces apoptosis via a ROS-dependent mechanism in human neuroblastoma SH-SY₅Y cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2012, 26(1):16-23.
- [22] KAMRAN M Z, PATLL P, GUDE R P. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances[J]. *Bio Med Res Int*, 2013, 2013:1-15.
- [23] WALKER S R, XIANG M, FRANK D A. Distinct roles of STAT3 and STAT5 in the pathogenesis and targeted therapy of breast cancer[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(1):616-621.
- [24] GEIGER J L, GRANDIS J R, BAUMAN J E. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations[J]. *Oral Oncol*, 2016, 56:84-92.

(本文编辑 耿波 厉建强)

- ~~~~~
- 2020, 75:30-34.
- [15] NJOKU A, KANNABHIRAN M, ARORA R, et al. Left atrial volume predicts atrial fibrillation recurrence after radiofrequency ablation: A meta-analysis[J]. *Europace*, 2018, 20(1):33-42.
- [16] JARRAL O A, SASO S, VECHT J A, et al. Does patent foramen ovale closure have an anti-arrhythmic effect? A meta-analysis[J]. *Int J Cardiol*, 2011, 153(1):4-9.
- [17] GOCH A, BANACH M, PIOTROWSKI G, et al. Echocardiographic evaluation of the left atrium and left atrial appendage function in patients with atrial septum aneurysm: Implications for thromboembolic complications[J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 55(6):365-370.
- [18] RIGATELLI G, ZUIN M, ADAMI A, et al. Left atrial enlargement as a marker of significant high-risk patent foramen ovale[J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2019, 35(11):2049-2056.
- ~~~~~
- (本文编辑 耿波 厉建强)