

新酪氨酸激酶抑制剂BGJ398对白血病细胞株KG-1细胞的抑制效应研究

姜玉 晁红颖 张修文 周民 卢绪章 张日 何川 王谦

【摘要】 目的 探讨针对FGFR1的酪氨酸激酶抑制剂BGJ398对人急性髓系白血病细胞株KG-1细胞的影响及可能的作用机制。方法 CCK-8法检测BGJ398对KG-1细胞增殖的影响;流式细胞术Annexin V/PI双重染色法检测BGJ398对细胞凋亡的影响;RQ-PCR检测细胞凋亡相关基因的表达;Western blot法检测凋亡相关蛋白、FGFR1OP2-FGFR1融合蛋白及信号通路分子磷酸化水平的表达变化。结果 BGJ398能有效抑制KG-1细胞增殖,抑制率呈剂量依赖性升高,并能诱导细胞凋亡。BGJ398作用KG-1细胞48 h后,与对照组比较凋亡相关基因Bcl-2表达下降(0.342 ± 0.054 对 1.026 ± 0.165 , $t = 3.94$, $P = 0.017$), caspase-3表达上调(0.456 ± 0.189 对 1.008 ± 0.091 , $t = 16.44$, $P < 0.001$), 差异均有统计学意义。与对照组相比, BGJ398作用组caspase-3活化蛋白表达增加,同时Bcl-2蛋白表达下调;FGFR1OP2-FGFR1融合蛋白水平及AKT、S6K1磷酸化水平下调,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.01), 但ERK磷酸化表达水平无明显改变。结论 BGJ398能有效抑制KG-1细胞增殖并诱导细胞凋亡,其机制可能与抑制FGFR1表达、下调Bcl-2水平、促进Caspase-3活化及抑制AKT和S6K磷酸化有关。

【关键词】 酪氨酸激酶抑制剂BGJ398; FGFR1蛋白; KG-1细胞; 8p11骨髓增殖综合征

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81500103);江苏省自然科学基金面上项目(BK-20151230);常州市高层次卫生人才培养工程(2016CZLJ027)

Inhibitory Effects of the novel tyrosine kinase inhibitor BGJ398 against human leukemic cell line KG-1 cells Jiang Yu*, Chao Hongying*, Zhang Xiwen, Zhou Min, Lu Xuzhang, Zhang Ri, He Chuan, Wang Qian. *Department of Hematology, Affiliated Changzhou Second Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213003, China

Corresponding author: Chao Hongying, Email: chaohy2006@126.com

【Abstract】 Objective To explore the effects and possible mechanisms of the novel pan-FGFR inhibitor BGJ398 on KG-1 cells in vitro. **Methods** Effects of BGJ398 on cells proliferation were detected by CCK-8, the apoptosis was assessed by Annexin V-FITC. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) analysis was used to detect the expression of apoptosis-related genes B cell lymphoma-2 (Bcl-2) and caspase-3. Western blotting analysis was performed to explore the proteins expression levels of Bcl-2, caspase-3 and the expression of p-AKT, p-S6K, p-ERK and FGFR1. **Results** BGJ398 effectively inhibited cell proliferation by dose-dependent manners. BGJ398 (1.4 $\mu\text{mol/L}$) induced apoptosis of KG-1 cells by 36.4%, compared with 4.5% in the control group ($P < 0.001$). Treatment with BGJ398 at 1.4 $\mu\text{mol/L}$ led to significant increases in the expression levels of caspase-3, and decreases in the expression of Bcl-2 ($P < 0.005$). In accordance with these results, Western blot analysis further confirmed the increased expression of Bcl-2 protein along with elevated caspase-3 activity. In addition, BGJ398 markedly down-regulated FGFR1OP2-FGFR1 fusion protein, p-AKT and p-S6K expression, but not p-ERK expression. **Conclusion** Novel pan-FGFR inhibitor BGJ398 substantially suppressed KG-1 cell growth and induced apoptosis by inhibiting the expression of FGFR1, p-AKT, p-S6K and regulating apoptosis-related proteins.

【Key words】 Tyrosine kinase inhibitor BGJ398; FGFR1; KG-1 cells; 8p11 myeloproliferative syndrome

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.02.013

作者单位: 213003 常州, 南京医科大学附属常州市第二人民医院血液科(姜玉、晁红颖、张修文、卢绪章); 苏州大学附属第一医院血液科(张日、何川、王谦); 常州市第三人民医院(周民)

通信作者: 晁红颖, Email: chaohy2006@126.com

Fund program: Youth Project of National Natural Science Foundation of China (81500103); The Natural Science Foundation of Jiangsu (BK-20151230); High-level Medical Talents Training Project of Changzhou (2016CZLJ027)

伴有 FGFR1 异常的髓系和淋巴系肿瘤亦称 8p11 骨髓增殖综合征(EMS),是一类罕见的、具有高白血病转化风险的侵袭性肿瘤,其主要分子生物学机制为定位于染色体 8p11 的 FGFR1 基因发生断裂重排,与定位于其他不同染色体的对手基因融合,导致细胞发生致瘤性转化^[1-3]。文献报道,EMS 由慢性期到急性白血期中位转化时间仅 2 个月^[3]。目前应用于慢性骨髓增殖性肿瘤(MPN)的干扰素、羟基脲及应用于急性白血病或淋巴瘤的传统化疗药物均不能改善 EMS 患者的预后,造血干细胞移植(HSCT)是唯一有潜在治愈可能的措施,但由于受年龄、供者、身体状况等原因的限制,仅少数患者最终能接受 HSCT。因此,针对 FGFR1 酪氨酸激酶的抑制剂成为 EMS 靶向治疗的首选,但一代及二代酪氨酸激酶抑制剂(TKI)并未显示出治疗优越性^[3]。本研究通过体外实验探索新一代酪氨酸激酶抑制剂 NVP-BGJ398 对携带 FGFR1OP2-FGFR1 融合基因的 KG-1 细胞株的抑制效应,以期为未来临床应用提供理论依据。

材料与方法

1. 主要试剂:BGJ398(美国 Selleck 公司产品)溶于 DMSO, -80 °C 保存。IMDM 培养基购自美国 Hyclone 公司,无支原体污染;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒购自中国 Biosharp 生物技术公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;RQ-PCR 逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;RQ-PCR 检测试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;引物由上海英骏生物技术有限公司合成;抗 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 生物科技公司;抗 AKT 抗体、抗 AKT 磷酸化抗体、抗 FGFR1 抗体、抗 Bcl-2 抗体、抗 caspase-3 抗体、抗 S6K1 抗体均购自美国 Abcam 公司;羊抗兔 HRP 标记二抗购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司。

2. 细胞来源和细胞培养:人白血病 KG-1 细胞株购自美国标准生物制品收藏中心(ATCC)。采用含 20%热灭活胎牛血清的 IMDM 培养基,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 d 更换 1 次细胞培养

基。实验所用细胞均处于对数生长期。

3. CCK-8 法检测 BGJ398 对细胞增殖的影响:取对数生长期的 KG-1 细胞接种于 96 孔板,每孔共 200 μ l,含细胞数为 5×10^4 个,加入 BGJ398,使其终浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 μ mol/L,并设 DMSO 对照组,每组设 3 个复孔。在培养箱中培养 48 h 后,加入 20 μ l CCK-8 溶液,在培养箱内继续孵育 4 h,用酶标仪检测 450 nm 处各孔的吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%)=(A_{对照组}-A_{药物组})/A_{对照组}×100%。

4. 流式细胞术检测细胞凋亡率:用 IMDM 培养基调整细胞密度为 5×10^5 /ml,接种于 6 孔板,设置 1.4 μ mol/L BGJ398 处理组及 DMSO 对照组。置培养箱中培养 48 h 后,收集待检测细胞并用 PBS 洗 1 次,结合缓冲液洗 1 次,用 100 μ l 结合缓冲液重悬。每管加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI,混匀后于室温避光孵育 15 min,加入结合缓冲液后,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

5. RQ-PCR 检测凋亡相关基因表达:实验分为 DMSO 对照组及 BGJ398 作用组,采用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA,测定其浓度和纯度并逆转录为 cDNA,以 GAPDH 作为内参,检测 DMSO 对照组、BGJ398 作用组凋亡相关基因 Bcl-2 及 caspase-3 相对表达水平。目的基因相对表达水平以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示, $\Delta\Delta CT = (CT_{\text{药物组目的基因}} - CT_{\text{药物组内参基因}}) - (CT_{\text{对照组目的基因}} - CT_{\text{对照组内参基因}})$ 。扩增引物:Bcl-2 基因上游引物为 5'-CAGGAAACGGCCCGGAT-3',下游引物为 5'-CT-GGGGCCTTTCATCCTCC-3';caspase-3 上游引物为 5'-CTCTGGTTTTTCGGTGGGTGT-3',下游引物为 5'-TCC AGAGTCCATTGATTCGCT-3';GAPDH 上游引物为 5'-GAAGGTG AAGGTCGGAGTC-3',下游引物为 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'。反应体系:cDNA 模板 2 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,SYBGreen Mix 10 μ l,ddH₂O 7 μ l。反应条件:50 °C 反应 2 min,95 °C 反应 2 min 进行预变性,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,进行 40 次循环,熔解曲线设置条件为 95 °C 反应 15 s,60 °C 反应 1 min,95 °C 反应 15 s。

6. Western blot 法检测凋亡相关蛋白及信号通

路分子磷酸化水平:分别收集BGJ398作用组及DMSO对照组细胞,用含1 mmol/L PMSF的RIPA裂解液裂解细胞,抽提细胞总蛋白,测定蛋白浓度,每孔蛋白上样量为60 μ g,用120 g/L的聚丙烯酰胺凝胶电泳2 h,湿转印至膜,50 g/L脱脂奶粉溶液室温封闭1 h后,加入相应的一抗孵育,4 $^{\circ}$ C过夜,用HRP标记的二抗室温温育2 h,ECL发光液显色,进行图像采集并用ImageJ分析软件进行灰度扫描分析。

7. 统计学处理:采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,数据以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. BGJ398对KG-1细胞增殖的影响:经CCK-8检测发现,不同浓度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 μ mol/L)的BGJ398对KG-1细胞作用48 h后,其增殖抑制作用呈剂量依赖性(图1)。以浓度为横坐标,细胞增殖抑制率为纵坐标绘制细胞增殖抑制曲线,计算得到BGJ398作用48 h的 IC_{50} 值为1.4 μ mol/L,以此为实验浓度和作用时间进行后续实验。

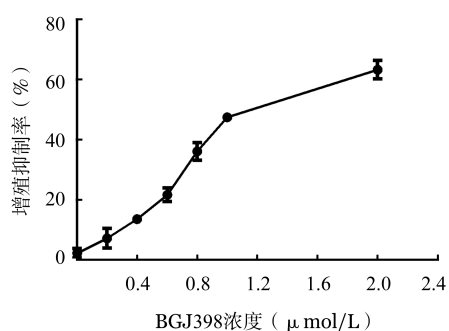


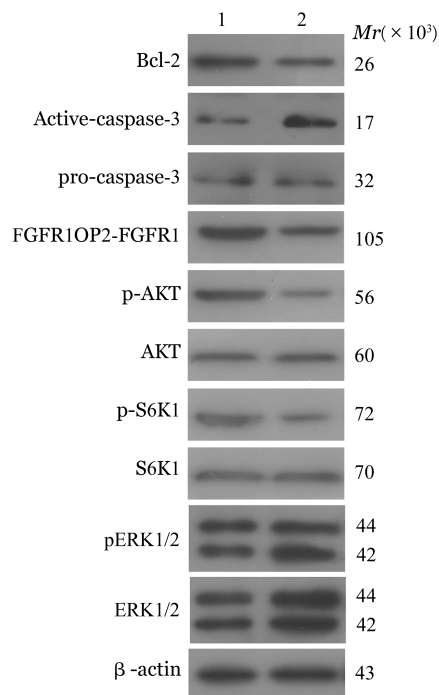
图1 CCK-8法检测BGJ398对KG-1细胞增殖的影响

2. BGJ398对KG-1细胞凋亡的影响:1.4 μ mol/L BGJ398作用KG-1细胞48 h后,细胞凋亡率为(36.5 \pm 0.8)%,DMSO对照组细胞凋亡率为(4.1 \pm 0.6)%,差异有统计学意义($t = 56.2, P < 0.001$)。

3. BGJ398对KG-1细胞凋亡相关基因mRNA表达的影响:KG-1细胞经BGJ398作用48 h后,Bcl-2基因表达水平较DMSO对照组明显下降(0.342 \pm 0.054对1.026 \pm 0.165, $t = 3.94, P = 0.017$),caspase-3基因表达水平较DMSO对照组明显上调(4.456 \pm 0.189对1.008 \pm 0.091, $t = 16.44, P < 0.001$)。

4. BGJ398对KG-1细胞凋亡相关蛋白、FGFR1

蛋白水平及信号通路蛋白磷酸化水平的影响:1.4 μ mol/L BGJ398作用KG-1细胞48 h后,采用Western blot法检测Bcl-2蛋白表达及caspase-3蛋白的活化情况,结果显示,和DMSO对照组相比,凋亡相关蛋白Bcl-2表达明显下降,而活化的caspase-3蛋白表达明显上调,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.01)。我们同时检测了FGFR1OP2-FGFR1融合蛋白表达及AKT、S6K1、ERK蛋白磷酸化和其总蛋白表达水平变化情况,结果显示,BGJ398显著抑制了FGFR1OP2-FGFR1融合蛋白表达及AKT、S6K1的磷酸化水平,和DMSO对照组相比,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.01),但对ERK磷酸化则无明显影响($P > 0.05$)。详见图2、表1。



1: DMSO对照组;2: BGJ398作用组

图2 Western blot法检测BGJ398作用KG-1细胞后caspase-3、Bcl-2、FGFR1蛋白的表达及AKT、S6K和ERK磷酸化水平

讨 论

BGJ398是新一代有效、选择性、口服型FGFR酪氨酸激酶小分子抑制剂,作用于FGFR1、FGFR2、FGFR3,分子式为C₂₆H₃₁Cl₂N₇O₃,相对分子质量为560,目前研究主要集中于伴有FGFR1基因异常的实体瘤患者如膀胱癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、胆管癌及子宫内膜癌等^[4-6]。I期临床试验表明,伴有FGFR1扩增的非小细胞肺癌及伴有FGFR3突变的膀胱泌尿系肿瘤患者服用BGJ398后显示了较好的耐受性及安全性,并表现出较强的抗肿瘤活性

表1 Western blot法检测BGJ398作用KG-1细胞48 h后Bcl-2、caspase3、FGFR1OP2-FGFR1蛋白的表达及AKT、S6K1和ERK磷酸化水平变化($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | Bcl-2 | Active-caspase-3 | FGFR1OP2-FGFR1 | p-AKT | p-S6K1 | p-ERK1/2 |
|------------|-------------|------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| DMSO对照组 | 0.781±0.036 | 0.576±0.007 | 0.432±0.032 | 1.262±0.005 | 1.061±0.001 | 0.771±0.005 |
| BGJ398作用组 | 0.456±0.005 | 1.296±0.033 | 0.208±0.019 | 0.632±0.001 | 0.537±0.004 | 0.854±0.090 |
| <i>t</i> 值 | 12.60 | 30.28 | 8.47 | 170.30 | 192.50 | 1.30 |
| <i>P</i> 值 | 0.006 | 0.001 | 0.014 | 0.001 | 0.001 | 0.323 |

注:每组设3个复孔,实验重复3次

[6]。2016年,Wu等^[7]建立了FGFR1过表达原发急性髓系白血病小鼠模型,在经BGJ398处理后,小鼠的白血病进展及总体生存情况均得以不同程度改善。最近,Malli等^[8]将新一代酪氨酸激酶抑制剂Ponatinib和BGJ398作用于转染TPR-FGFR1融合基因的32D细胞株,结果显示,两种FGFR靶向抑制剂均显示出较好的抑制细胞增殖效应,但BGJ398 IC₅₀值更低。

KG-1细胞株来源于一例急性髓系白血病患者,2006年由国外学者Gu等^[9]鉴定该细胞株携带FGFR1OP2-FGFR1融合基因,且其中的FGFR1保留了完整的酪氨酸结构域,具有激酶活性,是研究EMS的理想细胞模型。我们将不同浓度的BGJ398作用于KG-1细胞株48 h后,细胞的增殖抑制率呈现明显的剂量依赖性。进一步采用流式细胞术检测细胞凋亡率发现,与DMSO对照组相比,BGJ398作用的KG-1细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义。

细胞凋亡是细胞在各种死亡信号刺激后发生的一系列级联反应的主动死亡过程,它受多种基因调控,并与caspases家族和Bcl-2家族密切相关^[10-12]。caspases是一组具有相似氨基酸顺序、二级结构的半胱氨酸蛋白酶,其级联反应在凋亡通路中具有重要地位,尤其caspase-3是其中的中心环节,其活性水平变化能显著影响药物诱导肿瘤细胞凋亡的能力。既往研究显示,Bcl-2家族蛋白表达水平的变化,可以显著改变肿瘤细胞对化疗药物诱导凋亡的敏感性,在调控和执行凋亡的过程中,与caspase-3起决定性作用^[13]。近来,Göke等^[14]在研究中发现,BGJ398促进非小细胞肺癌细胞株H1581凋亡的机制是通过caspase依赖和非caspase依赖双途径实现的。我们的研究结果显示,BGJ398作用KG-1细胞48 h后,Bcl-2基因的mRNA表达和Bcl-2蛋白水平均明显下降,而caspase-3活化增加,因此,

BGJ398对凋亡相关蛋白的调节作用可能是诱导KG-1细胞凋亡的机制之一。

PI3K/AKT/mTOR信号通路是众多上游信号的整合点,通过激活相关下游信号,在细胞存活、增殖、凋亡、蛋白合成及代谢、血管新生及细胞周期调控、肿瘤的发生和发展等方面发挥重要作用,同时,该通路激活程度也是肿瘤患者预后生存的重要指标^[15]。Hu等^[16]将BGJ398作用于伴有高水平FGFR2基因表达的胃癌细胞株KATO III后进行Western blot检测结果显示,ERK1/2的磷酸化水平仅仅在BGJ398作用2 h后出现短暂下降,在24 h后其磷酸化抑制作用完全消失,对比之下,AKT的磷酸化水平下降则从药物作用2 h后持续至72 h,因此推测,AKT磷酸化水平的持续下调是BGJ398具有抗肿瘤作用的基本机制之一。但对于非小细胞肺癌细胞株H1581的研究显示,BGJ398作用后AKT磷酸化水平没有受到任何影响,相反,ERK1/2则出现了磷酸化水平的明显改变^[14]。因此,BGJ398对不同肿瘤细胞株的促凋亡机制不同。

既往的研究表明,FGFR1发生断裂重排后,与对手基因形成新的融合蛋白,使得FGFR1发生二聚化改变,继而其胞内酪氨酸残基发生自身磷酸化,并进一步激活下游信号传导通路,如PI3K/AKT、RAS/MAPK及JAK/STAT等^[3]。在伴有t(6;8)(q27;p12)/FOP1-FGFR1融合基因的EMS患者中,富含亮氨酸的FOP1可以引起FOP1-FGFR1融合蛋白二聚化并组成性激活FGFR1酪氨酸激酶及其下游信号通路PI3K/AKT,同时上调Bcl-2蛋白表达^[17]。Malla等^[18]研究显示,AKT是凋亡相关的蛋白表达的关键调节因子,AKT磷酸化水平改变会影响细胞凋亡基因表达。我们将BGJ398加入KG-1细胞共培养48 h后进行Western blot检测,结果显示BGJ398对AKT及S6K磷酸化水平有较强的抑制作用,同时伴有Bcl-2蛋白下调及caspase-3活化增加,但对ERK1/2

磷酸化几乎没有影响。因此推测,FGFR1抑制剂BGJ398促进KG-1细胞凋亡可能与抑制FGFR1OP2-FGFR1融合蛋白表达、下调Bcl-2水平、促进caspase-3活化及抑制AKT和S6K磷酸化有关。

总之,BGJ398作为进入临床试验阶段的新一代口服应用的FGFR抑制剂,不仅对实体瘤有较好的抗肿瘤活性,也可能是EMS患者潜在靶向治疗的选择之一。

参考文献

- [1] Macdonald D, Aguiar RC, Mason PJ, et al. A new myeloproliferative disorder associated with chromosomal translocations involving 8p11: a review[J]. *Leukemia*, 1995, 9(10):1628-1630.
- [2] Macdonald D, Reiter A, Cross NC. The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1 [J]. *Acta Haematol*, 2002, 107 (2):101- 107. DOI: 10.1159/000046639.
- [3] Jackson CC, Medeiros LJ, Miranda RN. 8p11 myeloproliferative syndrome: a review[J]. *Hum Pathol*, 2010, 41(4):461-476. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.11.003.
- [4] Guagnano V, Kauffmann A, Wöhrle S, et al. FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor [J]. *Cancer Discov*, 2012, 2 (12):1118-1133. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0210.
- [5] Guagnano V, Furet P, Spanka C, et al. Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(20):7066-7083. DOI: 10.1021/jm2006222.
- [6] Nogova L, Sequist LV, Perez Garcia JM, et al. Evaluation of BGJ398, a fibroblast growth factor receptor 1-3 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors harboring genetic alterations in fibroblast growth factor receptors: results of a global phase I, dose-escalation and dose-expansion study [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(2): 157-165. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.2048.
- [7] Wu Q, Bhole A, Qin H, et al. SCLLTargeting FGFR1 to suppress leukemogenesis in syndromic and de novo AML in murine models [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (31): 49733-49742. DOI: 10.18632/oncotarget.10438.
- [8] Malli T, Buxhofer-Ausch V, Rammer M, et al. Functional characterization, localization, and inhibitor sensitivity of the TPR-FGFR1 fusion in 8p11 myeloproliferative syndrome [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2016, 55(1):60-68. DOI: 10.1002/gcc.22311.
- [9] Gu TL, Goss VL, Reeves C, et al. Phosphotyrosine profiling identifies the KG-1 cell line as a model for the study of FGFR1 fusions in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2006, 108 (13): 4202-4204. DOI: 10.1182/blood-2006-06-026666.
- [10] Woo DH, Han IS, Jung G. Mefenamic acid-induced apoptosis in human liver cancer cell-lines through caspase-3 pathway [J]. *Life Sci*, 2004, 75 (20): 2439-2449. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.04.042.
- [11] Li M, Ding Y, Mu Y, et al. Molecular cloning and characterization of caspase-3 in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 30 (3):910-916. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.01.018.
- [12] Spampinato C, De Maria S, Sarnataro M, et al. Simvastatin inhibits cancer cell growth by inducing apoptosis correlated to activation of Bax and down-regulation of BCL-2 gene expression [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(4):935-941. DOI: 10.3892/ijo.2011.1273.
- [13] Petit A, Mwale F, Zukor DJ, et al. Effect of cobalt and chromium ions on bcl-2, bax, caspase-3, and caspase-8 expression in human U937 macrophages [J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (11): 2013-2018.
- [14] Göke A, Göke R, Ofner A, et al. The FGFR Inhibitor NVP-BGJ398 Induces NSCLC Cell Death by Activating Caspase-dependent Pathways as well as Caspase-independent Apoptosis [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(11):5873-5879.
- [15] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(7): 489-501. DOI: 10.1038/nrc839.
- [16] Hu Y, Lu H, Zhang J, et al. Essential role of AKT in tumor cells addicted to FGFR [J]. *Anticancer Drugs*, 2014, 25(2):183-188. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000034.
- [17] Guasch G, Ollendorff V, Borg JP, et al. 8p12 stem cell myeloproliferative disorder: the FOP-fibroblast growth factor receptor 1 fusion protein of the t(6;8) translocation induces cell survival mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathways [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21 (23):8129-8142. DOI: 10.1128/MCB.21.23.8129-8142.2001.
- [18] Malla R, Gopinath S, Alapati K, et al. Downregulation of uPAR and cathepsin B induces apoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and inhibition of the PI3K/Akt pathway in gliomas [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (10):e13731. DOI: 10.1371/journal.pone.0013731.

(收稿日期:2017-08-05)

(本文编辑:王叶青)