

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.005

· 基础研究 ·

PI3K/Akt/mTOR 通路抑制剂对白血病细胞株增殖及其 PHLPP 表达的影响

闫朝奇,张丽君,高峰,潘登,王萍萍,王亚柱(中国医科大学附属第一医院血液科,辽宁沈阳110001)

[摘要] **目的:**观察 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制剂 wortmannin 或 rapamycin 对白血病细胞株增殖及其 PHLPP (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) 蛋白表达的影响。**方法:**以不同浓度的 wortmannin 或 rapamycin 分别作用于人类髓细胞白血病细胞系 K562、HL-60,采用 WST-1 法检测细胞的增殖活性,Annexin V-FITC 双染流式细胞术检测细胞凋亡,Western blotting 法检测细胞中 p-Akt、Akt、PHLPP 蛋白的表达。**结果:**Wortmannin 以时间以及剂量依赖方式抑制 K562、HL-60 细胞的增殖 ($P < 0.05$),48 h 的 IC_{50} 值分别为 (187.6 ± 48.4) 、 (185.5 ± 48.1) nmol/L。100 nmol/L wortmannin 作用于 K562 细胞、50 nmol/L wortmannin 作用于 HL-60 细胞 12 和 24 h 后,细胞凋亡率均较对照细胞显著升高 [$(12.4 \pm 0.7)\%$ 、 $(17.6 \pm 2.3)\%$ vs $(5.0 \pm 0.6)\%$, $P < 0.05$; $(11.0 \pm 0.2)\%$ 、 $(17.9 \pm 1.6)\%$ vs $(6.8 \pm 0.4)\%$, $P < 0.05$]。Wortmannin 分别作用于 K562、HL-60 细胞 12、24、36 h 后,p-Akt、PHLPP 的蛋白表达水平明显降低;rapamycin 同样可使 K562、HL-60 细胞中 PHLPP 蛋白的表达水平降低。**结论:**PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂抑制白血病细胞株增殖的同时降低其 PHLPP 蛋白的表达。

[关键词] wortmannin;rapamycin;白血病;PI3K;Akt;mTOR;PHLPP;凋亡

[中图分类号] R733.7;R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)04-0369-05

Effect of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway inhibitors on proliferation and PHLPP protein expression of leukemia cell lines

YAN Chao-qi, ZHANG Li-jun, GAO Feng, PAN Deng, WANG Ping-ping, WANG Ya-zhu (Department of Hematology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:**To observe the effect of PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors wortmannin or rapamycin on the proliferation and PHLPP (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) protein expression of leukemia cell lines. **Methods:** Human leukemia cell lines K562 and HL-60 were treated with different concentrations of wortmannin or rapamycin. The proliferation of K562 and HL-60 cells was examined by WST-1 assay and the apoptosis of K562 and HL-60 cells was detected by Annexin V-FITC double staining flow cytometry. The expressions of PHLPP, phosphorated-Akt (p-Akt) and total Akt protein were detected by Western blotting. **Results:** Wortmannin inhibited the proliferation of K562 and HL-60 cells in a dose- and time-dependent manner, with the IC_{50} value of 48 h being (187.6 ± 48.4) nmol/L and (185.5 ± 48.1) nmol/L ($P < 0.05$). After treating K562 cells with 100 nmol/L wortmannin and HL-60 with 50 nmol/L wortmannin for 12 and 24 h, the apoptosis rates were significantly higher than those in the control group [$(12.4 \pm 0.7)\%$, $(17.6 \pm 2.3)\%$ vs $(5.0 \pm 0.6)\%$, $P < 0.05$; $(11.0 \pm 0.2)\%$, $(17.9 \pm 1.6)\%$ vs $(6.8 \pm 0.4)\%$, $P < 0.05$]. After treating K562 and HL-60 cells with wortmannin for 12, 24 and 36 h, the protein expressions of p-Akt and PHLPP were significantly reduced. And rapamycin also down-regulated the protein expression of PHLPP in K562 and HL-60 cells. **Conclusion:** The inhibitor of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway inhibit the proliferation as well as PHLPP protein expression of leukemia cell lines.

[Key words] wortmannin; rapamycin; leukemia; PI3K; Akt; mTOR; PHLPP; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(4): 369-373]

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(No.20072105)。Project supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province (No.20072105)

[作者简介] 闫朝奇(1984-),男,江苏省赣榆市人,硕士,主要从事白血病发病机制与靶向治疗研究。E-mail:suyoucongzh@163.com

[通信作者] 张丽君(ZHANG Li-jun, corresponding author),E-mail:lzhang202003@yahoo.com.cn

[网络出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120727.1102.004.html

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种骨髓造血干/祖细胞高度异质性克隆性疾病,其特点是未成熟粒细胞的增殖失控。失常的细胞信号通路与功能失调的转录因子起协同作用,促进造血祖细胞向白血病转化。在这方面异常活化的信号通路有 PI3K/Akt、mTORC1、ERK/MAPK、STAT3/5、Wnt/ β -catenin 和 NF- κ B 等^[1-2],其中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的异常活化通常被认为在白血病的发生、发展中起重要作用^[3]。该通路的异常活化机制与调节该通路的几种磷酸酶表达失常或功能异常有关,调节该通路的蛋白磷酸酶如 PTEN、PP2A 在白血病中研究较多^[4-5],但另外一种与之相关的蛋白磷酸酶 PHLPP(PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase)在实体瘤^[6-7]中研究较多,在白血病中研究少见。

PHLPP 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶,通过使 Akt 的 Thr308 和 Ser473 位点去磷酸化而终止其下游信号转导。PHLPP 表达于细胞核、胞质和细胞膜上,其家族包括 PHLPP1 α 、PHLPP1 β 和 PHLPP2,相对应的基因分别位于 18q21.33 和 16q22.3^[8]。PHLPP 相对应的基因在许多实体瘤内如结肠癌^[6]、乳腺癌^[7]中经常缺失。PHLPP 的缺失导致细胞中的 Akt 持续磷酸化,进而导致肿瘤的发生、发展;恢复结肠癌细胞中 PHLPP 的表达后,可抑制结肠癌细胞的异常增殖^[9]。PHLPP 在白血病细胞株中的表达如何,以及 PHLPP 表达的调控机制尚不明确。本研究旨在使用 PI3K 抑制剂 wortmannin 及 mTOR 抑制剂 rapamycin 作用于白血病细胞株,观察 PHLPP 蛋白表达的变化,并探讨白血病的发病机制与治疗方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PI3K 抑制剂 wortmannin (Cat. 6816750) 以及 mTOR 抑制剂 rapamycin (Cat. 553210) 均购自 Merck 公司, RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司 (Cat. 31800-014)。兔抗人 PHLPP 抗体 (ab71927) 购自 Abcam 公司,兔抗人 p-AKT1/2/3 (Ser473) (sc33437)、AKT1/2/3 (H136) (sc8312) 购自 Santa Cruz 公司,HRP 标记羊抗兔 IgG 为北京博奥森生物技术有限公司 (bse-0295G),30% 丙烯酰胺-双丙烯酰胺溶液及 Super ECL Plus 超敏发光液为北京普利莱基因技术有限公司产品。Annexin-V/PI 凋亡检测试剂盒 (KGA106) 为南京凯基生物公司产品。

1.2 细胞系及细胞培养

人白血病细胞株 K562、早幼粒细胞白血病细胞株 HL-60 及急性单核细胞白血病细胞株 U937 由我院血液室常规保存,均培养于 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中,37 °C、5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱内,1~2 d 传代 1 次。

1.3 WST-1 法检测 wortmannin 对 K562 及 HL-60 细胞增殖的影响

取对数生长期细胞,以 1% 新生牛血清 RPMI 1640 培养基接种于 96 孔板,每孔终体积 100 μ l,细胞密度为 5×10^4 /ml,加入不同浓度 wortmannin,使终浓度分别为 10、50、100 nmol/L;等体积浓度的 DMSO 为空白对照组。每组设 3 个复孔。37 °C、5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱内培养 24、48、72 h 后每孔加入 WST-1 10 μ l,继续培养 2 h 后避光震荡 1 min。酶联免疫检测仪上 450 nm 波长处测各孔 *D* 值,计算细胞的增殖抑制率。细胞增殖的抑制率 (%) = (1 - 实验组 *D* 值/对照组 *D* 值) \times 100%。

1.4 Western blotting 法检测白血病细胞株中 PHLPP、p-Akt 和 Akt 蛋白的表达

K562 细胞以 1% 小牛血清 RPMI 1640 接种于 6 孔培养板,加入终浓度为 100 nmol/L 的 wortmannin 或 100 nmol/L 的 rapamycin;HL-60 细胞以 1% 小牛血清 RPMI 1640 接种于 6 孔培养板,加入终浓度为 50 nmol/L 的 wortmannin 或 100 nmol/L 的 rapamycin, DMSO \leq 0.1%,培养一段时间后收集细胞。离心收集 $5 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ 个细胞,预冷 PBS 洗涤 3 次,加入 100 μ l RIPA 细胞裂解液、100 mmol/L 1 μ l PMSF 和 1 μ l 磷酸酶抑制剂混合物,冰上裂解 30 min,4 °C $10\ 000 \times g$ 离心后收集上清,BCA 法测蛋白浓度。加入 5 \times 蛋白上样缓冲液,100 °C 变性 10 min,每孔上样量 50 μ g 进行电泳,然后湿转至 PVDF 膜,5% BSA 封闭 2 h 或过夜,分别加入 β -actin 一抗 (1:500)、p-Akt 或 Akt 一抗 (1:200)、PHLPP 一抗 (1:3000) 孵育 2 h 或 4 °C 过夜,用含 0.05% Tween 20 的 TBST 洗膜 3 次,加入 HRP 标记二抗 (1:1000) 室温孵育 2 h,洗膜 3 次,ECL 发光拍照。

1.5 Annexin-V/PI 双染流式细胞术检测 wortmannin 对白血病细胞株凋亡的影响

按试剂盒说明书操作,6 孔板接种 K562、HL-60 细胞后,加入 wortmannin,使终浓度分别为 100、50 nmol/L。于 0、12、24 h 后收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次, $369 \times g$ 离心 5 min,收集 5×10^5 个细胞。加入 500 μ l 的结合缓冲液悬浮细胞。加入 5 μ l AnnexinV-FITC 混匀后,加入 5 μ l PI,混匀后室温避光反应 10 min,上机检测。用 Win MDI 2.9 分析软件分析数据。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件,组间数据比较应用 *t* 检验,多组数据比较应用 One-way ANOVA 统计分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PI3K 抑制剂 wortmannin 抑制 K562 及 HL-60 细胞的增殖

由表 1 可见,不同浓度的 PI3K 抑制剂 wortmannin 作用于 K562 或 HL-60 细胞后,随着时间的延长,其细胞增殖抑制率也随之增高,呈明显的时间与剂量依赖关系。Wortmannin 对 K562 及 HL-60 细胞作用 48 h 的 IC_{50} 值分别为 (187.6 ± 48.4) 、 (185.5 ± 48.1) nmol/L。同一时间不同浓度药物组的细胞增殖抑制率差别具有统计学意义 ($P < 0.01$)

表 1 Wortmannin 剂量和时间依赖性抑制 K562 及 HL-60 细胞的增殖 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 1 Wortmannin inhibited proliferation of K562 and HL-60 cells in a dose- and time-dependent manner ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Wortmannin ($c_B/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Treatment time (t/h)		
	24	48	72
K562			
0	1.0 ± 0.3	2.8 ± 0.2	6.0 ± 0.4
10	$14.5 \pm 0.7^{**}$	$19.6 \pm 1.2^{**}$	$34.5 \pm 3.2^{**}$
50	$16.6 \pm 3.7^{**}$	$28.7 \pm 1.0^{**}$	$47.0 \pm 2.4^{**}$
100	$27.5 \pm 2.1^{**}$	$42.3 \pm 2.1^{**}$	$47.8 \pm 3.0^{**}$
HL-60			
0	1.7 ± 0.4	3.5 ± 0.6	9.4 ± 0.5
10	$18.2 \pm 2.9^{**}$	$25.4 \pm 4.1^{**}$	$28.9 \pm 1.4^{**}$
50	$24.7 \pm 2.1^{**}$	$27.4 \pm 1.7^{**}$	$41.2 \pm 4.8^{**}$
100	$29.7 \pm 2.4^{**}$	$44.2 \pm 4.5^{**}$	$52.8 \pm 1.9^{**}$

** $P < 0.01$ vs 0 group

2.2 PI3K 抑制剂 wortmannin 诱导 K562 及 HL-60 细胞的凋亡

以 100 nmol/L 的 PI3K 抑制剂 wortmannin 作用于 K562 细胞 0、12、24 h 后,Annexin-V FITC/PI 双染后流式细胞术检测结果(图 1)显示,随着时间的延长,K562 细胞的凋亡率显著增加,从 12 h 的 $(12.4 \pm 0.7)\%$ 增加到 24 h 的 $(17.6 \pm 2.3)\%$,与对照组的 $(5.0 \pm 0.6)\%$ 相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。以 50 nmol/L 的 wortmannin 作用于

HL-60 细胞 0、12、24 h 后,Annexin-V FITC/PI 双染后流式细胞术检测结果(图 1)显示,随着时间的延长 HL-60 细胞的凋亡率显著增加,从 12 h 的 $(11.0 \pm 0.2)\%$ 增加到 24 h 的 $(17.9 \pm 1.6)\%$,与对照组 $(6.8 \pm 0.4)\%$ 相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

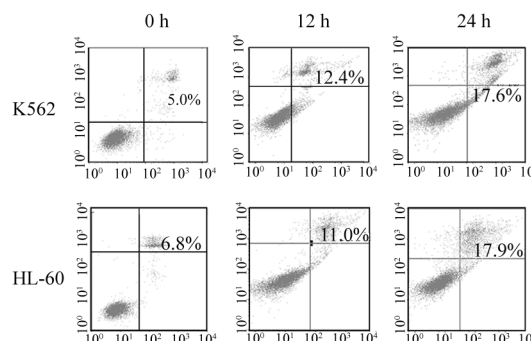


图 1 流式细胞术检测 wortmannin 诱导 K562 及 HL-60 细胞的凋亡

Fig. 1 Wortmannin induced apoptosis of K562 and HL-60 cells detected by flow cytometry

2.3 PI3K 抑制剂 wortmannin 及 mTOR 抑制剂 rapamycin 对 K562 及 HL-60 细胞中 PHLPP 表达的影响

提取对数生长期 K562、U937 及 HL-60 细胞蛋白,Western blotting 检测 PHLPP 的表达。结果(图 2)显示,PHLPP 蛋白在 K562 细胞及 HL-60 细胞中表达,在 U937 细胞中表达缺失。

以 50 nmol/L wortmannin 作用 HL-60 细胞、以 100 nmol/L wortmannin 作用 K562 细胞,0、12、24、36 h 后,Western blotting 法检测 PHLPP、p-Akt 和 Akt 蛋白的表达,结果(图 3)显示,随时间延长,K562 及 HL-60 细胞中 p-Akt 表达下降,总 Akt 不变,PHLPP 表达下降。

以 rapamycin 100 nmol/L 作用于 K562 及 HL-60 细胞不同时间后,Western blotting 法检测 PHLPP 蛋白的表达,结果(图 4)显示,随着时间的延长,K562 及 HL-60 细胞中 PHLPP 蛋白的表达下降。

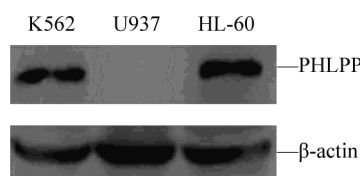


图 2 PHLPP 蛋白在白血病细胞株中的表达情况
Fig. 2 Expression of PHLPP in leukemia cell lines

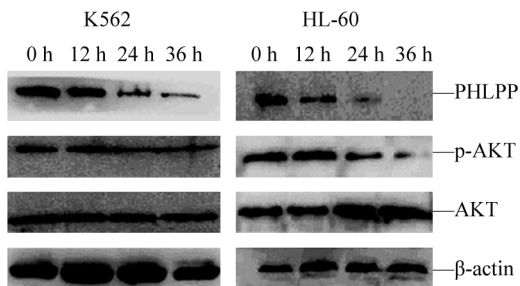


图3 Wortmannin对K562及HL-60细胞中p-Akt、Akt及PHLPP蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of wortmannin on p-Akt, Akt and PHLPP protein expressions in K562 and HL-60 cells

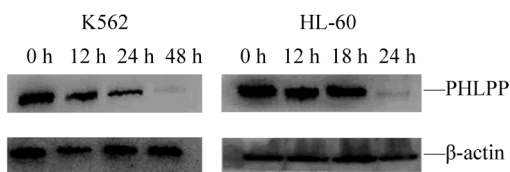


图4 Rapamycin对K562及HL-60细胞中PHLPP蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of rapamycin on PHLPP protein expression in K562 and HL-60 cells

3 讨论

PI3K/Akt/mTOR信号通路对生理血和恶性造血均起重要作用^[10-11]。体外实验^[12]表明,PI3K特异性抑制剂通过下调该信号通路的活性进而影响与细胞增殖或凋亡相关的细胞因子的表达,PI3K特异性抑制剂对白血病细胞表现出强有力的细胞杀伤活性。本研究使用PI3K特异性抑制剂wortmannin同样抑制了K562及HL-60细胞的增殖,并诱导其凋亡,与文献报道相一致。因U937细胞并不表达PHLPP,使用wortmannin后不能观察到PHLPP表达的变化,故未予干预。但研究^[13]表明,下调PI3K/Akt信号通路活性后,同样使U937细胞表现出增殖抑制。Rapamycin作为一种mTOR特异性抑制剂,对白血病细胞株K562、HL-60及U937的增殖抑制及诱导凋亡作用均微弱^[14],可能是由于使用rapamycin处理白血病细胞后,反而可以上调PI3K/Akt信号通路活性,增加p-Akt表达^[15],故本实验未研究其对白血病细胞株增殖的抑制作用。

急性髓系白血病患者PI3K/Akt/mTOR信号通路活性上调的原因不清,也许与下列因素有关:Fms

样酪氨酸激酶3(Fms-like tyrosine kinase 3,FLT3)受体^[16]和c-Kit酪氨酸激酶受体^[17]的突变激活、N-Ras或K-Ras突变^[18]、PI3K p110 β 和(/或)PI3K p110 δ 过度表达^[19],自分泌或旁分泌增殖因子的分泌如胰岛素样增殖因子-1(insulin-like growth factor-1,IGF-1)^[20]、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)^[21],以及白血病细胞与骨髓基质细胞通过CXCR4的相互作用^[22]等。PI3K/Akt信号通路在肿瘤细胞中的过度激活除了与上述因素有关外,其信号通路调节蛋白PHLPP的低表达也可能在部分肿瘤中发挥了重要作用。

本研究发现,PHLPP在HL-60及K562细胞中表达较高,而在U937细胞中不表达,推测仅U937细胞中PI3K/Akt信号通路的异常激活与PHLPP的表达缺失有关,这可能与U937细胞中染色体畸变涉及16、18号染色体有关^[23]。文献^[24]报道,PHLPP在K562细胞及慢粒白血病细胞中低表达,与本研究结果不符,可能是由于本研究使用多克隆抗体检测总PHLPP,而该文献使用单克隆抗体检测PHLPP的不同亚型,亦或是由于各实验室使用的K562细胞株存在差别所致。

PHLPP的表达调控机制近年来也有相关研究。有文献^[25]报道,在结肠癌内 β -Trep介导的泛素化可以降解PHLPP,并且此降解过程受p-Akt的负性调控。本研究通过使用wortmannin降低K562及HL-60细胞的p-Akt后,发现PHLPP的水平也随之降低,与该文献报道一致。另有文献^[26]报道,在结肠癌内PHLPP的表达受mTOR依赖蛋白的调控。本研究使用mTOR抑制剂rapamycin作用于K562及HL-60细胞后,同样发现PHLPP的表达下调。可见PHLPP在白血病细胞中的表达可能一方面与p-Akt调节其降解有关,另一方面与mTOR依赖蛋白的调控有关,从而证明PI3K/Akt/mTOR信号通路在白血病细胞中同实体瘤一样,也存在与PHLPP相关的反馈抑制回路。有研究^[26]发现,PHLPP在肿瘤治疗过程中表达减低与治疗效果不理想相关。本研究使用单信号通路抑制剂下调p-Akt或抑制mTOR活性,同时也使PHLPP的表达下调,部分解释了使用单信号通路抑制剂治疗白血病尤其是复发难治白血病效果欠理想的原因。因此,近年来针对该信号通路的靶向治疗研究均倾向于使用双激酶抑制剂同时抑制PI3K和mTOR信号。

本实验观察了PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制剂对白血病细胞株K562、HL-60增殖和凋亡的影响,发现PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制剂可抑制

K562、HL-60 细胞的增殖,诱导 HL-60 细胞凋亡;此外,还能抑制白血病细胞株中 PHLPP 蛋白的表达。本实验为靶向抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路治疗白血病提供了相关的实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Baumgartner B, Weber M, Quirling M, et al. Increased I-kappaB kinase activity is associated with activated NF-kappaB in acute myeloid blasts [J]. *Leukemia*, 2002, 16(10): 2062-2071.
- [2] Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia [J]. *Leukemia*, 2008, 22(4): 686-707.
- [3] Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma [J]. *Blood*, 2006, 108(5): 1668-1676.
- [4] Keniry M, Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy [J]. *Oncogene*, 2008, 27(41): 5477-5485.
- [5] Cristobal I, Garcia-Orti L, Cirauqui C, et al. Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome that contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2012, 97(4): 543-550.
- [6] Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(7): 1608-1614.
- [7] Rakha EA, Green AR, Powe DG, et al. Chromosome 16 tumor-suppressor genes in breast cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006, 45(6): 527-535.
- [8] Sattler M, Salgia R, Okuda K, et al. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway [J]. *Oncogene*, 1996, 12(4): 839-846.
- [9] Liu J, Weiss HL, Rychahou P, et al. Loss of PHLPP expression in colon cancer: Role in proliferation and tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2009, 28(7): 994-1004.
- [10] Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, et al. PTEN dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells [J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 475-482.
- [11] Zhang J, Grindley JC, Yin T, et al. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukemia prevention [J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 518-522.
- [12] Zhao S, Konopleva M, Cabreira-Hansen M, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2004, 18(2): 267-275.
- [13] Gao N, Budhraj A, Cheng S, et al. Phenethyl isothiocyanate exhibits antileukemic activity *in vitro* and *in vivo* by inactivation of Akt and activation of JNK pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2(4): e140.
- [14] Mise J, Dembitz V, Banfic H, et al. Combined inhibition of PI3K and mTOR exerts synergistic antiproliferative effect, but diminishes differentiative properties of rapamycin in acute myeloid leukemia cells [J]. *Pathol Oncol Res*, 2011, 17(3): 645-656.
- [15] Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, et al. Mammol/Lalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: Rationale for therapeutic inhibition of both pathways [J]. *Blood*, 2008, 111(1): 379-382.
- [16] Muranyi AL, Dedhar S, Hogge DE. Combined inhibition of integrin linked kinase and FMS-like tyrosine kinase 3 is cytotoxic to acute myeloid leukemia progenitor cells [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(4): 450-460.
- [17] Faderl S, Pal A, Bornmann W, et al. Kit inhibitor APcK110 induces apoptosis and inhibits proliferation of acute myeloid leukemia cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(9): 3910-3917.
- [18] Birkenkamp KU, Geugien M, Schepers H, et al. Constitutive NF-kappaB DNA-binding activity in AML is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway [J]. *Leukemia*, 2004, 18(1): 103-112.
- [19] Billotet C, Grandage VL, Gale RE, et al. A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16 [J]. *Oncogene*, 2006, 25(50): 6648-6659.
- [20] Wahner Hendrickson AE, Haluska P, Schneider PA, et al. Expression of insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor-1 receptor in human acute myelogenous leukemia: Effect of the dual-receptor inhibitor BMS-536924 *in vitro* [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7635-7643.
- [21] Imai N, Miwa H, Shikami M, et al. Growth inhibition of AML cells with specific chromosome abnormalities by monoclonal antibodies to receptors for vascular endothelial growth factor [J]. *Leuk Res*, 2009, 33(12): 1650-1657.
- [22] Zeng Z, Shi YX, Samudio IJ, et al. Targeting the leukemia micro-environment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML [J]. *Blood*, 2009, 113(24): 6215-6224.
- [23] Lee JY, Lee CH, Shim SH, et al. Molecular cytogenetic analysis of the monoblastic cell line U937: Karyotype clarification by G-banding, whole chromosome painting, microdissection and reverse painting, and comparative genomic hybridization [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002, 137(2): 124-132.
- [24] Hirano I, Nakamura S, Yokota D, et al. Depletion of pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatases 1 and 2 by Bcr-Abl promotes chronic myelogenous leukemia cell proliferation through continuous phosphorylation of Akt isoforms [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(33): 22155-22165.
- [25] Li X, Liu J, Gao T. β -TrCP-mediated ubiquitination and degradation of PHLPP1 are negatively regulated by Akt [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(23): 6192-6205.
- [26] Liu J, Stevens PD, Gao T. mTOR-dependent regulation of PHLPP expression controls the rapamycin sensitivity in cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(8): 6510-6520.

[收稿日期] 2012 - 02 - 07

[修回日期] 2012 - 05 - 26

[本文编辑] 王莹