

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.11.1196

· 论 著 ·

AKT 抑制剂 GSK2141795 诱导人肝癌细胞株 Huh7 凋亡的剂量和时间效应

刘志勇¹, 李林林², 刘善荣^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院实验诊断科, 上海 200433

2. 江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013

[摘要] **目的** 观察不同药物浓度和作用时间下蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶 AKT 抑制剂 GSK2141795 对人肝癌细胞株 Huh7 凋亡的影响及其剂量和时间效应。**方法** 分别使用终浓度为 0、0.3、1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSK2141795 处理 Huh7 细胞 24 h, 同时选择终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSK2141795 分别处理 Huh7 细胞 0、2、6、12、24 和 48 h。利用蛋白质印迹法检测 Huh7 细胞中 AKT、磷酸化 AKT^{S473} (p-AKT^{S473}) 的蛋白表达水平, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, qPCR 和蛋白质印迹法分别检测细胞中凋亡相关分子 Bad、Bcl-2、Caspase-9 的表达水平。**结果** 蛋白质印迹分析结果显示, 在 0~10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 随着 GSK2141795 终浓度的增加, Huh7 细胞中 AKT 蛋白表达水平逐渐降低, p-AKT^{S473} 蛋白表达水平逐渐升高; 在 0~24 h 范围内, 随着 GSK2141795 作用时间的延长, Huh7 细胞中 AKT 蛋白的表达水平呈降低趋势、p-AKT^{S473} 蛋白的表达水平呈升高趋势; 48 h 时 AKT 蛋白和 p-AKT^{S473} 蛋白的表达水平较 0 h 均升高。流式细胞术检测结果显示, 随着 GSK2141795 浓度的增加和作用时间的延长, Huh7 细胞的凋亡比例逐渐增加。qPCR 及蛋白质印迹分析结果提示 Huh7 细胞中凋亡效应分子 Bad、Caspase-9 表达水平逐渐增加, 凋亡拮抗分子 Bcl-2 表达水平逐渐降低。**结论** AKT 抑制剂 GSK2141795 能有效抑制 AKT 蛋白表达, 并能通过下游 Bad-Bcl-2 通路诱导 Huh7 细胞凋亡, 其药物效应呈一定的浓度和时间依赖性。此外, 长时间使用 GSK2141795 刺激 Huh7 细胞, AKT 蛋白表达可再次升高, 提示存在负反馈信号环路。

[关键词] 肝细胞癌; 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶 AKT; 蛋白激酶抑制剂; 细胞凋亡**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)11-1196-06

Time and dose effects of AKT inhibitor GSK2141795 on apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line Huh7

LIU Zhi-yong¹, LI Lin-lin², LIU Shan-rong^{1*}

1. Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To explore the time and dose effects of AKT (a kind of protein serine/threonine kinase) inhibitor GSK2141795 on the apoptosis of human hepatocellular cell line Huh7. **Methods** Huh7 cells were treated with GSK2141795 at the concentrations of 0, 0.3, 1, 3, 10 and 30 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. A concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ GSK2141795 was selected to treat Huh7 cells for 0, 2, 6, 12, 24 and 48 h. The protein expression levels of AKT and phosphorylated AKT^{S473} (p-AKT^{S473}) were determined by Western blotting and cell apoptosis was detected by flow cytometry. The expression levels of apoptosis-related proteins (Bad, Bcl-2 and Caspase-9) were measured by qPCR and Western blotting. **Results** With the increase of GSK2141795 concentration, AKT protein level in Huh7 cells was gradually decreased and the p-AKT^{S473} protein level was gradually increased within the range of 0-10 $\mu\text{mol/L}$. With the prolongation of GSK2141795 treatment time, the AKT protein level was gradually decreased and the p-AKT^{S473} protein level was gradually increased within the range of 0-24 h. At 48 h of treatment, the AKT protein and p-AKT^{S473} protein expression levels were increased compared with 0 h. With the increase of GSK2141795 concentration and treatment time, the proportion of apoptotic cells was gradually increased, the expression levels of apoptotic molecules Bad and Caspase-9 were gradually increased, and the expression level of apoptotic antagonist Bcl-2 was gradually decreased. **Conclusion** AKT inhibitor GSK2141795 can effectively inhibit AKT protein expression, and induce apoptosis of Huh7 cells through Bad-Bcl-2 pathway in a dose- and time-dependent manner. In

[收稿日期] 2018-06-18 **[接受日期]** 2018-09-07**[基金项目]** 国家杰出青年科学基金(81425019). Supported by National Science Fund for Distinguished Young Scholars (81425019).**[作者简介]** 刘志勇, 硕士. E-mail: liuzy271@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162091, E-mail: liushanrong@hotmail.com

addition, the expression level of AKT protein in Huh7 cells can increase again after long-term stimulation by GSK2141795, suggesting the existence of a negative feedback signal loop.

[Key words] hepatocellular carcinoma; protein-serine-threonine kinase AKT; protein kinase inhibitors; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(11): 1196-1201]

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和病死率均较高, 严重威胁着国民的健康。肝癌发病机制复杂, 其中蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶 AKT 信号转导通路的过度活化在肝癌的发生中起着至关重要的调控作用^[1]。同时, AKT 信号通路在肿瘤细胞周期调控、增殖、凋亡、能量代谢等多种细胞生命活动中均发挥重要作用^[1-2]。有研究报道, AKT 抑制剂能有效抑制肿瘤细胞的生长, 同时促使其凋亡, 具有广阔的临床应用前景^[3-4]。GSK2141795 是一种 AKT 广谱抑制剂, 能有效抑制 AKT 活性。本研究选取人肝癌细胞株 Huh7 进行体外实验, 初步探讨不同 GSK2141795 浓度及作用时间对 Huh7 细胞的生物学效应, 为后续实验中 AKT 抑制剂的使用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器 人肝癌细胞株 Huh7 为海军军医大学(第二军医大学)长海医院实验诊断科保存; DMEM 培养基和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; AKT 抑制剂 GSK2141795 购自美国 MCE 公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自上海博光生物科技有限公司; AKT (货号 A3154)、磷酸化 AKT^{S473} (p-AKT^{S473}, 货号 AP0655)、Bad (货号 A0741)、Bcl-2 (货号 A0208)、Caspase-9 (货号 A2636) 和 GAPDH (货号 AC027) 抗体均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 流式细胞仪(BD FACSCanto™ II Flow Cytometer) 及细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD Biosciences 公司。

1.2 细胞培养及实验分组 人肝癌细胞株 Huh7 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期的细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 待细胞融合度达 60% 时, 实验组分别加入终浓度为 0.3、1、3、10、30 μmol/L 的 GSK2141795, 对照组(0 μmol/L) 加入等体积的 DMSO, 继续培养 24 h, 检测各组细胞凋亡和相关蛋白与基因的表达情况。另取对数生长期的细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 实验组加入终浓度为 10 μmol/L 的 GSK2141795 分别培养 2、

6、12、24 和 48 h, 对照组(0 h) 加入等体积的 DMSO 培养, 检测各组细胞凋亡和相关蛋白与基因的表达情况。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡 收集贴壁和悬浮细胞, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 2 次, 根据流式细胞术商品化试剂盒的使用说明进行膜联蛋白 V (annexin V)/碘化丙啶(propidium iodide, PI) 染色后, 上机检测。

1.4 蛋白质印迹法检测相关蛋白表达 收集细胞, 加入 200 μL 蛋白裂解液, 用 BCA 法检测蛋白浓度。取等量蛋白上样, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜上, 用 5% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h 后, 分别加入相应抗体(稀释比例为 1:1 000), 于 4 °C 下孵育过夜。用 TBST 洗涤后加入相应二抗, 室温孵育 1 h 后加入化学发光试剂, 利用 ImageQuant LAS 4000 化学发光成像仪进行显像。

1.5 qPCR 检测相关基因的表达 收集细胞, 使用 RNAfast200 总 RNA 快速抽提试剂盒(上海飞捷生物技术有限公司) 提取总 RNA, 按照 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒(日本 TaKaRa 公司) 操作说明, 反转录合成 cDNA。以 β -actin 为内参基因, 使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒(日本 TaKaRa 公司) 在 LightCycle 480 qPCR 系统(美国 Roche 公司) 中进行扩增。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法对目标基因表达水平进行相对定量分析。引物序列: *Bad* 上游 5'-CGA GTG AGC AGG AAG ACT CC-3', 下游 5'-CAC CAG GAC TGG AAG ACT CG-3'; *Bcl-2* 上游 5'-TGT GTG TGG AGA GCG TCA AC-3', 下游 5'-GAA ATC AAA CAG AGG CCG CAT-3'; *Caspase-9* 上游 5'-TCA CAG ACC TTG AGA CCC GA-3', 下游 5'-GAC GGG TCC AGC TTC ACT A C-3'; 内参 β -actin 上游 5'-CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC-3', 下游 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT-3'。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。检验水准(α) 为 0.05。

2 结果

2.1 GSK2141795 呈剂量依赖性诱导 Huh7 细胞凋亡 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比,不同浓度 GSK2141795 处理 Huh7 细胞 24 h 后,细胞形态发生明显改变,细胞发生皱缩、变形,细胞膜完整,胞内出现空泡,同时部分贴壁细胞变圆、脱落,漂浮于培养液表面。随着 GSK2141795 浓度的增加,细胞形态变化趋势越明显,提示 GSK2141795 处理能诱导 Huh7 细胞凋亡。蛋白质印迹分析结果 (图 1A) 显示,与对照组相比,随着 GSK2141795 浓度的增加,实验组细胞中 AKT 蛋白的表达水平逐渐降低, p-AKT^{S473} 蛋白表达水平逐渐升高,呈一定的剂量依赖性。终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSK2141795 处理 24 h 后细胞出现大量凋亡,无法提取蛋白,故未行相关蛋白表达水平的检测。流式细胞术检测结果见图 1B。终浓度为

0.3 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSK2141795 处理 Huh7 细胞 24 h 后,其细胞凋亡比例与对照组比较差异无统计学意义 [(4.19 \pm 0.85)% vs (4.50 \pm 0.28)% , $P > 0.05$]; 终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞凋亡比例开始增加 [(9.17 \pm 1.32)%]; 终浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞凋亡比例达到 (17.64 \pm 3.11)%; 终浓度为 10、30 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞凋亡比例均超过 50.00%,分别为 (62.70 \pm 8.57)%、(61.75 \pm 6.09)%。终浓度为 1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 时的细胞凋亡比例与对照组比较差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。qPCR (图 1C) 与蛋白质印迹检测结果 (图 1D) 显示,不同浓度 GSK2141795 处理 24 h 后, Huh7 细胞中 Bad 和 Caspase-9 在 mRNA 和蛋白水平上表达均升高, Bcl-2 在 mRNA 和蛋白水平上表达水平均降低,呈一定的剂量依赖性,提示 GSK2141795 可能通过 Bad-Bcl-2 通路诱导 Huh7 细胞发生凋亡。

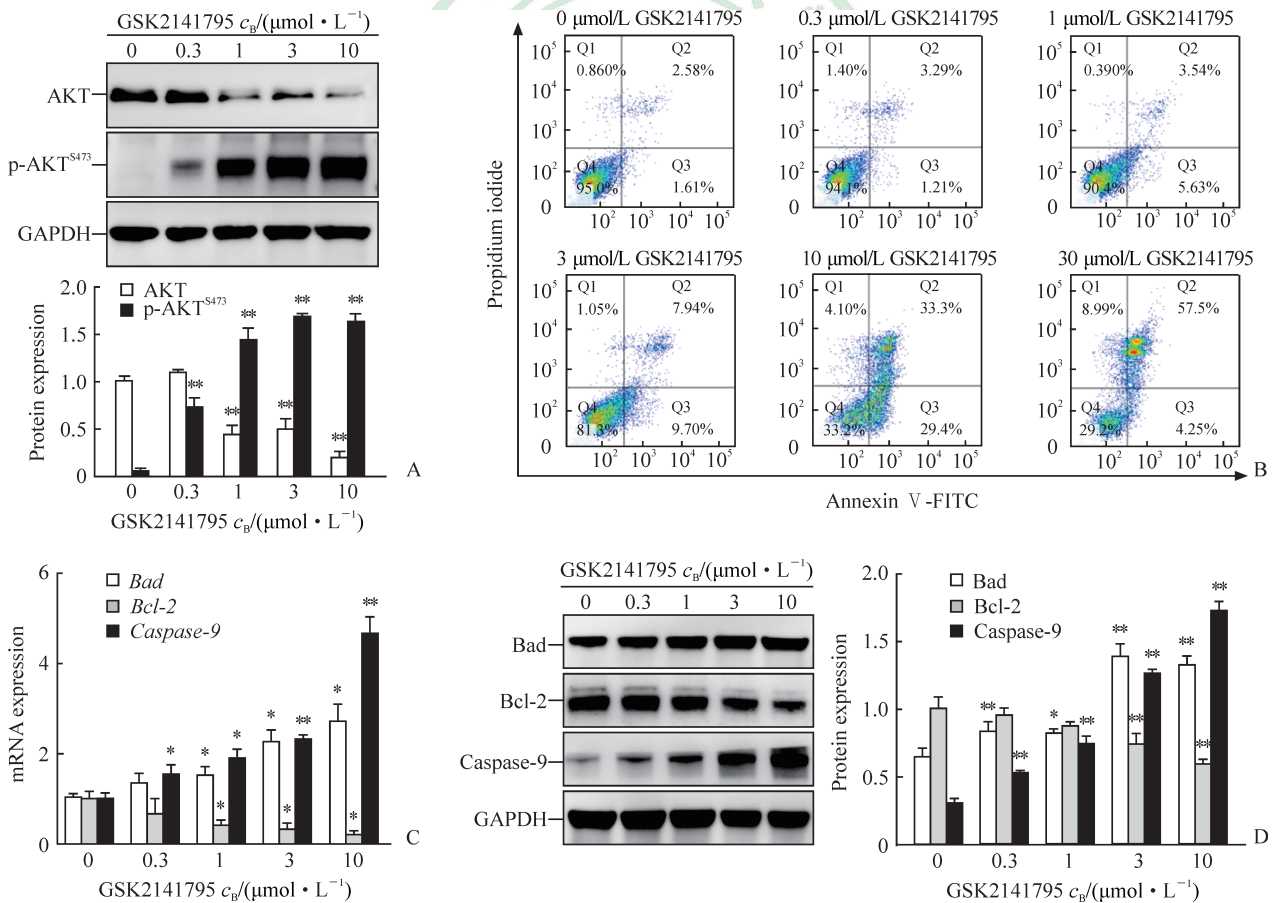


图 1 不同终浓度的 GSK2141795 作用人肝癌细胞株 Huh7 24 h 后对细胞凋亡的影响

Fig 1 Effects of GSK2141795 at different concentrations on apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line Huh7 after 24 h treatment

A: Protein expression of AKT and AKT phosphorylation on Ser-473 (p-AKT^{S473}) by Western blotting; B: Apoptosis of Huh7 cells by flow cytometry; C: mRNA expression of *Bad*, *Bcl-2* and *Caspase-9* by qPCR; D: Protein expression of *Bad*, *Bcl-2* and *Caspase-9* by Western blotting. AKT: A kind of protein serine/threonine kinase. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ (control) group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 GSK2141795 呈时间依赖性诱导 Huh7 细胞凋亡 以 10 μmol/L GSK2141795 分别处理 Huh7 细胞不同时间, 蛋白质印迹分析结果 (图 2A) 显示, 0~24 h 时 AKT 蛋白的表达水平呈逐渐降低趋势, p-AKT^{S473} 蛋白的表达水平呈逐渐升高趋势; 48 h 时 AKT 蛋白的表达水平上升, 且较对照组 (0 h) 明显升高, p-AKT^{S473} 蛋白的表达水平也升高。流式细胞术检测结果见图 2B。10 μmol/L GSK2141795 处理 Huh7 细胞 2、6、12 h 后, 细胞凋亡比例分别为 (17.29±2.13)%、(15.33±1.59)%、(17.22±3.06)%、与对照组比较差异均有统计学意义 (P 均<0.05); 处理细胞 24、48 h 后, 细胞凋亡比例进一步升高,

分别达 (59.20±5.72)%、(55.70±7.16)%, 与对照组比较差异均有统计学意义 (P 均<0.01), 虽然 24 h 和 48 h 两组间细胞凋亡比例差异无统计学意义 (P>0.05), 但药物处理 48 h 后晚期细胞凋亡比例高于药物处理 24 h 后的晚期细胞凋亡比例 [(43.1±2.77)% vs (24.6±1.52)%、P<0.05]。结果提示随着药物作用时间的延长, 细胞凋亡逐渐加重, 从早期凋亡向晚期凋亡发展。qPCR (图 2C) 与蛋白质印迹分析结果 (图 2D) 显示, 随着 GSK2141795 作用时间的延长, Huh7 细胞中 Bad、Caspase-9 的 mRNA 及蛋白表达水平逐渐升高, Bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达水平逐渐下降, 呈一定的时间依赖性。

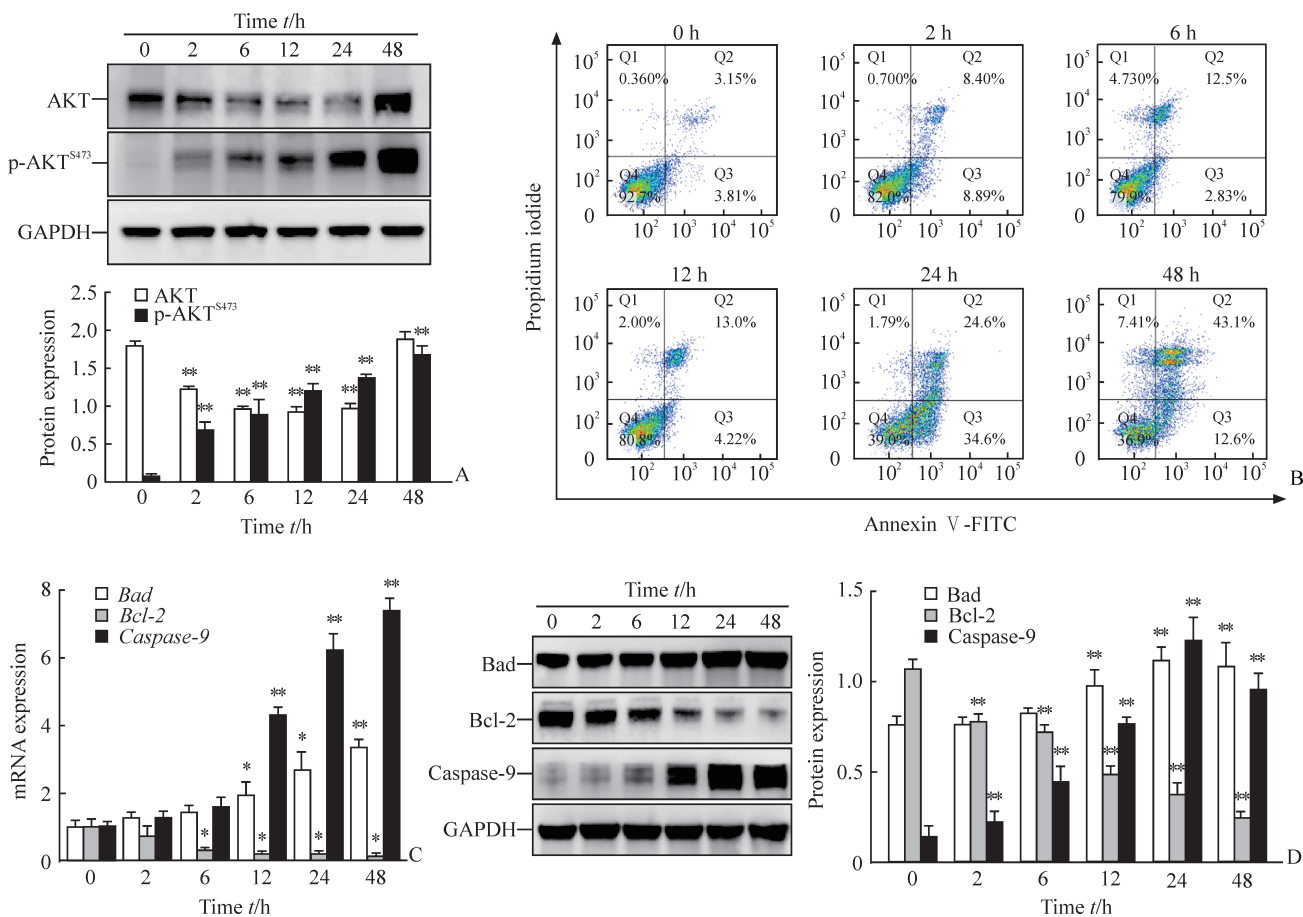


图 2 10 μmol/L GSK2141795 作用不同时间后对人肝癌细胞株 Huh7 凋亡的影响
Fig 2 Effect of 10 μmol/L GSK2141795 on apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line Huh7 at different time points

A: Protein expression of AKT and AKT phosphorylation on Ser-473 (p-AKT^{S473}) by Western blotting; B: Apoptosis of Huh7 cells by flow cytometry; C: mRNA expression of *Bad*, *Bcl-2* and *Caspase-9* by qPCR; D: Protein expression of *Bad*, *Bcl-2* and *Caspase-9* by Western blotting. AKT: A kind of protein serine/threonine kinase. *P<0.05, **P<0.01 vs 0 h (control) group. n=3, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

AKT 家族包含 AKT1、AKT2 和 AKT3 3 个

亚型, 其中 AKT1 主要参与细胞增殖^[5], AKT2 与胰岛素信号通路相关^[6], AKT3 则在大脑发育中具有重要作用^[7]。AKT 及其下游相关分子异常活化

是肝癌中重要的信号通路之一^[1],对肿瘤患者的病程进展及后续治疗起到至关重要的作用^[8-10]。针对 AKT 信号通路,研究人员目前已研发出多种类型的抑制剂,并开展了临床研究^[11]。如哌立福辛为烷基磷胆碱磷脂衍生物,其不仅能抑制 AKT 相关信号通路,对丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路也有一定的抑制作用^[12],已有多项临床试验表明哌立福辛对实体肿瘤及恶性血液系统疾病具有治疗作用^[13-16]。GSK2141795 为一种广谱 AKT 抑制剂,能有效抑制 AKT1/2/3 的活性,已开展相关临床研究^[17]。近期有研究人员通过招募伴有 AKT 突变的子宫内膜癌或前列腺癌患者,对 GSK2141795 的推荐 II 期剂量进行探索,结果显示肿瘤患者每日服用 75 mg GSK2141795 是安全耐受的^[17]。但 GSK2141795 作为一种潜在的抗肿瘤药物,其在体外肿瘤细胞中的应用及药物效应尚未见报道。

本研究在体外培养的人肝癌细胞株 Huh7 中加入 AKT 抑制剂 GSK2141795,观察不同药物浓度和不同作用时间后 Huh7 细胞的形态变化及凋亡情况。结果显示随着 GSK2141795 浓度的增加,细胞形态逐渐发生变化,细胞凋亡比例增加,同时 AKT 表达下降,AKT 蛋白磷酸化水平升高,与既往研究结果^[18-19]一致。Han 等^[19]研究证实 AKT 抑制剂导致 AKT 蛋白磷酸化升高的机制是该信号通路中存在反馈环路,该反馈环路能迅速通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 2 (mammalian target of rapamycin complex 2, mTORC2) 通路促使 AKT 蛋白磷酸化。此外,本研究还发现 Huh7 细胞的凋亡比例和 AKT 蛋白磷酸化水平随药物作用时间的延长而逐渐升高,药物作用 24 h 后细胞明显凋亡。药物作用 0~24 h 时,AKT 蛋白的表达随作用时间的延长而降低;作用 48 h 时,AKT 蛋白表达再次升高。推测可能是因为 AKT 抑制剂能促使细胞中 AKT 蛋白磷酸化,而高度磷酸化的 AKT 蛋白反馈性削弱长期使用抑制剂的药物效果,从而导致 AKT 蛋白表达水平再次升高,这可能也是长期使用化学治疗药物而导致肿瘤耐药的原因之一。针对这一现象,我们后续将开展相关研究。

在细胞凋亡方面,既往研究发现 AKT 活化有

助于细胞避免发生同源性磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 介导的细胞凋亡,同时降低肿瘤细胞对促凋亡因子的敏感性^[20]。AKT 失活能有效抑制肿瘤生长且特异性诱导 AKT 高度活化的肿瘤细胞发生凋亡^[21];同时抑制肿瘤细胞 AKT1 和 AKT2 的活性则可显示更强大的促凋亡能力^[20,22]。AKT 通路对细胞凋亡的影响可通过多种胞内途径发挥作用^[23],其中 Bcl-2 为凋亡抑制蛋白,是细胞凋亡蛋白家族中最重要的调控分子。Bad 为促凋亡蛋白,研究发现 AKT 是 Bad 的激酶之一,AKT 活化后能促使 Bad 磷酸化,从而阻断细胞凋亡^[24]。Caspase-9 是细胞凋亡的启动者和效应者,而 AKT 活化也能促使 Caspase-9 磷酸化,抑制其促凋亡能力^[25]。本研究发现随着 GSK2141795 作用浓度的增加及作用时间的延长,Huh7 细胞凋亡比例逐渐增加,促凋亡蛋白 Bad 及凋亡效应分子 Caspase-9 的表达升高,而凋亡拮抗蛋白 Bcl-2 的表达水平降低,提示 GSK2141795 可通过下游 Bad-Bcl-2 凋亡通路诱导 Huh7 细胞发生凋亡。

综上所述,本研究首次在人肝癌细胞株 Huh7 中验证了 AKT 抑制剂 GSK2141795 的药物效应与其药物浓度及作用时间的关系,旨在为后续体外实验中合理使用 GSK2141795 提供理论依据,同时为进一步认识 AKT 相关信号通路及开发新的肝癌治疗手段提供参考。

[参考文献]

- [1] MANNING B D, TOKER A. AKT/PKB signaling: navigating the network[J]. *Cell*, 2017, 169: 381-405.
- [2] YUAN T L, CANTLEY L C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme[J]. *Oncogene*, 2008, 27: 5497-5510.
- [3] WANG Q, YU W N, CHEN X, PENG X D, JEON S M, BIRNBAUM M J, et al. Spontaneous hepatocellular carcinoma after the combined deletion of Akt isoforms[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29: 523-535.
- [4] ALMHANNA K, STROSBERG J, MALAFA M. Targeting AKT protein kinase in gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31: 4387-4392.
- [5] CHEN W S, XU P Z, GOTTLÖB K, CHEN M L, SOKOL K, SHIYANOVA T, et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the *Akt1* gene[J]. *Genes Dev*, 2001, 15: 2203-2208.
- [6] CHO H, MU J, KIM J K, THORVALDSEN J L, CHU Q,

- CRENSHAW E B 3rd, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β)[J]. *Science*, 2001, 292: 1728-1731.
- [7] EASTON R M, CHO H, ROOVERS K, SHINEMAN D W, MIZRAHI M, FORMAN M S, et al. Role for Akt3/protein kinase B γ in attainment of normal brain size[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 1869-1878.
- [8] YANG Z Z, TSCHOPE O, BAUDRY A, DÜMMLER B, HYNX D, HEMMING S A. Physiological functions of protein kinase B/Akt[J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(Pt 2): 350-354.
- [9] LI H, ZENG J, SHEN K. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2014, 290: 1067-1078.
- [10] BELLACOSA A, KUMAR C C, DI CRISTOFANO A, TESTA J R. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting[J]. *Adv Cancer Res*, 2005, 94: 29-86.
- [11] PAL S K, RECKAMP K, YU H, FIGLIN R A. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19: 1355-1366.
- [12] GILLS J J, DENNIS P A. Perifosine: update on a novel Akt inhibitor[J]. *Curr Oncol Rep*, 2009, 11: 102-110.
- [13] CHEE K G, LONGMATE J, QUINN D I, CHATTA G, PINSKI J, TWARDOWSKI P, et al. The AKT inhibitor perifosine in biochemically recurrent prostate cancer: a phase II California/Pittsburgh cancer consortium trial[J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2007, 5: 433-437.
- [14] MA Z, ZHU L, LUO X, ZHAI S, LI P, WANG X. Perifosine enhances mTORC1-targeted cancer therapy by activation of GSK3 β in NSCLC cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13: 1009-1017.
- [15] BENDELL J C, NEMUNAITIS J, VUKELJA S J, HAGENSTAD C, CAMPOS L T, HERMANN R C, et al. Randomized placebo-controlled phase II trial of perifosine plus capecitabine as second- or third-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 4394-4400.
- [16] RICHARDSON P G, WOLF J, JAKUBOWIAK A, ZONDER J, LONIAL S, IRWIN D, et al. Perifosine plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma previously treated with bortezomib: results of a multicenter phase I / II trial[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 4243-4249.
- [17] AGHAJANIAN C, BELL-MCGUINN K M, BURRIS H A 3rd, SIU L L, STAYNER L A, WHEELER J J, et al. A phase I, open-label, two-stage study to investigate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the oral AKT inhibitor GSK2141795 in patients with solid tumors[J]. *Invest New Drugs*, 2018, 36: 1016-1025.
- [18] JACOBSEN K, BERTRAN-ALAMILLO J, MOLINA M A, TEIXIDÓ C, KARACHALIOU N, PEDERSEN M H, et al. Convergent Akt activation drives acquired EGFR inhibitor resistance in lung cancer[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8: 410. doi: 10.1038/s41467-017-00450-6.
- [19] HAN E K, LEVERSON J D, MCGONIGAL T, SHAH O J, WOODS K W, HUNTER T, et al. Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition[J]. *Oncogene*, 2007, 26: 5655-5661.
- [20] DEFEO-JONES D, BARNETT S F, FU S, HANCOCK P J, HASKELL K M, LEANDER K R, et al. Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4: 271-279.
- [21] JETZT A, HOWE J A, HORN M T, MAXWELL E, YIN Z, JOHNSON D, et al. Adenoviral-mediated expression of a kinase-dead mutant of Akt induces apoptosis selectively in tumor cells and suppresses tumor growth in mice[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 6697-6706.
- [22] MAYER I A, ARTEAGA C L. The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment[J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67: 11-28.
- [23] TANG B, TANG F, WANG Z, QI G, LIANG X, LI B, et al. Upregulation of Akt/NF- κ B-regulated inflammation and Akt/Bad-related apoptosis signaling pathway involved in hepatic carcinoma process: suppression by carnosis acid nanoparticle[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 6401-6420.
- [24] FULDA S. Synthetic lethality by co-targeting mitochondrial apoptosis and PI3K/Akt/mTOR signaling[J]. *Mitochondrion*, 2014, 19 Pt A: 85-87.
- [25] HU B, SUN M, LIU J, HONG G, LIN Q. The preventative effect of Akt knockout on liver cancer through modulating NF- κ B-regulated inflammation and Bad-related apoptosis signaling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48: 1467-1476.