

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.30.004

MK-2206 与顺铂协同抑制人三阴性乳腺癌 MDA-MB-468 细胞增殖的研究*

杨凡¹, 刘钰妮³, 王世恩³, 汤桂成³, 夏燕^{2△}, 曹春雨^{2,3▲}

(1. 三峡大学第二人民医院肿瘤放疗科, 湖北宜昌 443000; 2. 湖北民族学院附属民大医院风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000; 3. 三峡大学医学院肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北宜昌 443002)

[摘要] **目的** 研究 Akt 抑制剂 MK-2206 对顺铂抗人三阴性乳腺癌 MDA-MB-468 细胞增殖的影响。方法 CCK-8 法分析 MK-2206 对 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制作用。Western blot 检测 MK-2206 单独或联合顺铂对 MDA-MB-468 细胞内 Akt 磷酸化水平、凋亡相关基因 Bax/Bcl-2 及 MDA-MB-468 细胞质内细胞色素 C 蛋白表达水平的影响。Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡。使用 Chou-Talalay 中位效应与联合指数模型分析药物联合效应。**结果** MK-2206 对 MDA-MB-468 细胞增殖具有抑制作用, 且呈剂量和时间依赖性, 其 24 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)为 11.23 μmol/L。过表达组活化的 Akt 能够将顺铂对 MDA-MB-468 细胞的 24 h IC₅₀ 从 1.12 μmol/L 提高到 1.75 μmol/L, 显著拮抗顺铂对 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制效应。2 μmol/L MK-2206 可显著抑制 MDA-MB-468 细胞内 Akt 激酶活性, 表现为 Akt Thr308 和 Ser473 磷酸化水平显著下降; 顺铂处理不影响 MDA-MB-468 细胞内 Akt 磷酸化水平。单独使用 2 μmol/L MK-2206 处理 MDA-MB-468 细胞 24 h 不能诱导 MDA-MB-468 细胞凋亡, 2 μmol/L MK-2206 可促进顺铂诱导的 MDA-MB-468 细胞内细胞色素 C 从线粒体向细胞质的转移和上调 Bax 基因表达、下调 Bcl-2 基因表达, 显著促进细胞凋亡发生。**结论** MK-2206 与顺铂产生药物协同效应抑制 MDA-MB-468 细胞增殖, 并促进顺铂诱导的 MDA-MB-468 细胞凋亡。

[关键词] Akt 抑制剂; MK-2206; 顺铂; 三阴性乳腺癌; MDA-MB-468 细胞

[中图分类号] R319

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)30-3858-05

Study of Akt inhibitor MK-2206 synergizes with cisplatin to inhibit the proliferation of human triple negative breast cancer cells MDA-MB-468*

YANG Fan¹, LIU Yuni³, WANG Shien³, TANG Guicheng³, XIA Yan^{2△}, CAO Chunyu^{3▲}

(1. Department of Tumor Radiochemotherapy, the Second People's Hospital of Yichang city, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443000, China; 2 Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China; 3. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Medical College of China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Akt inhibitor MK-2206 combined with cisplatin on proliferation of human triple negative breast cancer MDA-MB-468 cells. **Methods** The effect of Akt inhibitor MK-2206 alone or combine with cisplatin on MDA-MB-468 cells growth was analyzed with CCK-8. Protein expression of Bcl-2/Bax, Cyto C and protein phosphorylation of Akt was detected with Western blot. Cell apoptosis was analyzed with Annexin V/PI double staining. The synergy, additivity, or antagonism of MK-2206 and cisplatin combination treatment was determined with Chou-Talalay median effect and combination index (CI) model. **Results** MK-2206 could significantly inhibit MDA-MB-468 cells growth in a time and dose dependent manner and the IC₅₀ value of MK-2206 against MDA-MB-468 cells was 11.23 mol/L. Over-expression of constitutively activated Akt significantly increased the IC₅₀ value of cisplatin against MDA-MB-468 cells from 1.12 mol/L to 1.75 mol/L. 2 mol/L of MK-2206 dramatically down-regulated phosphorylation level of Akt Thr308/Ser473 in MDA-MB-468 cells, meanwhile cisplatin treatment did not affect Akt phosphorylation in MDA-MB-468 cells. 2 mol/L of MK-2206 alone could not induce apoptosis, but significantly promoted apoptosis in

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81772833); 湖北省科技知识创新专项基金资助项目(2017CFB556); 湖北省宜昌市科学研究与开发项目(A17-301-23); 风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室开放基金(OIR17008A)。作者简介: 杨凡(1980-), 主治医师, 硕士, 主要从事乳腺肿瘤放疗研究。△ 通信作者, E-mail: caocy@ctgu.edu.cn; ▲ 共同通信作者, E-mail: xiayan861111@163.com。

MDA-MB-468 cell which induced by cisplatin, and at the same time the expression of Bax, cytochrome-c in cytoplasm was up-regulated and Bcl-2 was down-regulated. **Conclusion** MK-2206 combined with cisplatin synergistically inhibited the growth of MDA-MB-468 cells, and promoted apoptosis which induced by cisplatin.

[Key words] Akt inhibitor; MK-2206; cisplatin; triple negative breast cancer; MDA-MB-468 cells

三阴性乳腺癌泛指不表达或低表达雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体-2(HER-2)的一类乳腺癌^[1]。尽管三阴性乳腺癌仅占临床乳腺癌病例的 15%~20%,但相比其他类型,三阴性乳腺癌侵袭能力强,常伴有远处多发肿瘤转移,因而患者预后差。近年来,多种针对 ER 或 HER-2 靶点的抗乳腺癌小分子药物和抗体如他莫昔芬、拉帕替尼、曲妥珠单抗等显示了临床治疗乳腺癌的效果^[2-3]。但三阴性乳腺癌不表达或低表达上述受体,对上述靶向治疗不敏感,目前仍亟需除化疗以外的抗三阴性乳腺癌药物和治疗方法。信号通路蛋白 Akt,即蛋白激酶 B 在多种肿瘤发生发展过程中发挥重要作用,已成为重要的抗肿瘤治疗靶点^[4]。研究表明, Akt 可通过其激酶活性介导 PI3K-Akt-mTOR 信号通路过度活化,促进三阴性乳腺癌的发生发展,是治疗三阴性乳腺癌的靶点^[5]。目前已开发了多种 Akt 激酶抑制剂,如 MK-2206、Afuresertib 和厚朴酚等用于临床抗肿瘤治疗研究^[6-8]。其中, MK-2206 是一种口服有效的变构 Akt 抑制剂,目前已进入 II 期临床抗肿瘤研究。有研究表明, MK-2206 能有效逆转乳腺癌细胞系 MCF-7 对阿霉素的耐药性^[9]。鉴于 Akt 在三阴性乳腺癌发生发展中的重要作用,本研究使用 Akt 抑制剂 MK-2206 与三阴性乳腺癌临床一线化疗药物顺铂联合用于抗 MDA-MB-468 细胞增殖作用研究,以评价抑制 Akt 活性对顺铂抗三阴性乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 人三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-468 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。DMEM 细胞培养基购自 Gibico 公司,胎牛血清购自天津灏洋公司。质粒 pCMV-3tag6-ac-Akt 和其对照质粒载体 pCMV-3tag6 为北京协和医学院董文吉教授馈赠,并经上海生工公司 DNA 测序验证。MK-2206、CCK-8 试剂盒购自 MCE 公司、顺铂购自 Sigma 公司, BCA 试剂盒、Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自 Thermo 公司。抗人 Bax、Bcl-2、Cytochrome C 和抗人 β -actin(C4)购自 Santa Cruz 公司。抗人 Akt、pSer473 Akt、pThr308 Akt 购自 Cell Signaling Technology 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠和羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法细胞增殖检测 细胞传代于 96 孔细胞培养板(1×10^3 个/孔), 16 h 后以 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 梯度浓度 MK-2206 和 0~10 mol/L 梯度浓度顺铂分

别处理 MDA-MB-468 细胞 24、48 h。对照组加入等体积二甲基亚砜(DMSO),以不加入 CCK-8 试剂的细胞对照组为空白组。达药物处理指定时间点后,弃去细胞培养基、每孔加入 100 μL 含 CCK-8 试剂的细胞培养基,继续培养 3 h。使用全波长酶标分析仪检测 450 nm 波长的光密度(OD)值,并以如下计算公式计算细胞存活率,使用 CompuSyn 2.0 软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

细胞存活率(%) = [(药物处理组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)] \times 100%

1.2.2 Western blot 分析蛋白表达 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 RIPA 全细胞裂解液加入蛋白酶抑制剂 cocktail 后重悬细胞,放置于混旋仪上 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 15 min。然后以 10 000 \times g 离心 10 min,分离细胞裂解液上清液,以 BCA 法测定其总蛋白含量。然后加入上样缓冲液并于 100 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后完成样品制备。样本以总蛋白 25 g/孔上样后经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转(250 mA, 2.5 h)至硝酸纤维素膜。然后以 TBST (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4)溶液配制的 5% 脱脂奶粉溶液对硝酸纤维素膜室温封闭 1 h,再分别加一抗(Cytochrome C 1 : 3 000, Bax 1 : 1 000, Bcl-2 1 : 1 000, β -actin 1 : 3 000, Akt 1 : 1 000, pSer473 Akt 1 : 1 000, pThr308 Akt 1 : 1 000。以含 1% 小牛血清清蛋白 TBST 溶液稀释)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 共孵育 16 h 洗涤后与辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 3 000, TBST 溶液稀释)于室温孵育 1 h,最后加入 ECL 试剂,使用 Bioshine 显影仪(上海欧翔科学仪器有限公司)显影。 β -actin 为样品内参照。

1.2.3 Annexin V/PI 双染法分析细胞凋亡 传代细胞至 6 孔板(2×10^5 个/孔), 16 h 后以 2 mol/L MK-2206 与 0.5 mol/L 顺铂分别或联合处理 MDA-MB-468 细胞 24 h 后以胰酶消化,加入磷酸盐缓冲液(pH 7.4)重悬成单个细胞悬液。按照试剂盒操作步骤进行 PI 和 Annexin V 标记,以流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司)检测。

1.2.4 线粒体裂解液和细胞质裂解液的制备 本实验中使用预冷的细胞裂解液 500 μL 于冰上裂解 1×10^6 个细胞 15 min,使细胞膜裂解而保留线粒体膜和细胞核膜完整,然后于 1 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 将细胞核与线粒体组分和细胞质分离。再收集上清液于 12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 沉淀线粒体,离心所得上清液为细胞质。然后使用 200 μL 线粒体裂解液[10 mmol/L Tris(pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 5 mmol/L EDTA(pH 8.0), 临用

前加入蛋白酶抑制剂 cocktail]于 4 °C 裂解 15 min, 获得线粒体蛋白裂解液。

1.2.5 质粒转染 传代 2×10^5 个细胞于 6 孔细胞培养板并持续培养 16 h 使细胞生长至 80% 融合, 取质粒 pCMV-3tag6-ac-Akt(随过表达组) 和其对照质粒载体 pCMV-3tag6(空白组) 以 Lipofectamine2000™ 试剂进行细胞转染, 实验中每孔细胞取 2 g 质粒和 4 L Lipofectamine2000™, 按照生产商提供的操作步骤实施。转染 36 h 后, 进行相应药物处理或制备细胞裂解液进行蛋白表达分析。

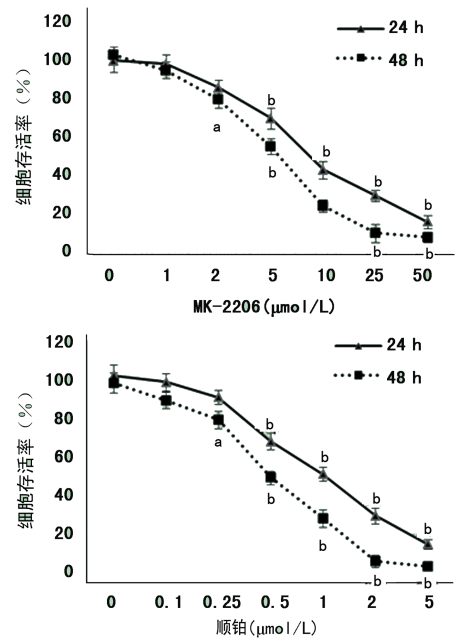
1.2.6 细胞增殖的药物协同作用分析 细胞接种于 96 孔细胞培养板(1×10^4 个/孔)、继续培养 16 h 使细胞生长至 80% 融合, 同时加入顺铂和 MK-2206(终浓度为 0、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂 + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ MK-2206、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂 + 0.25 $\mu\text{mol/L}$ MK-2206、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂 + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ MK-2206、1 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂 + 1 $\mu\text{mol/L}$ MK-2206、2 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂 + 2 $\mu\text{mol/L}$ MK-2206、5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂 + 5 $\mu\text{mol/L}$ MK-2206), 每个药物浓度设 3 个复孔。24 h 后, 以前述 CCK-8 法进行细胞增殖检测。按照 Chou-Talalay 中位效应与联合指数模型进行顺铂和 MK-2206 联合效应分析^[10-11], 实验数据以 CompuSyn 2.0 软件进行药物联合作用分析, 两药物的联合指数(combination index, CI) < 1 为协同效应。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较以双侧 *t* 检验分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MK-2206 抑制 MDA-MB-468 细胞增殖 MK-2206 和顺铂均能够以浓度和时间依赖性的方式显著抑制 MDA-MB-468 细胞增殖, 其中 MK-2206 的 24 h IC_{50} 为 11.23 $\mu\text{mol/L}$ 、顺铂的 24 h 半数抑制浓度为

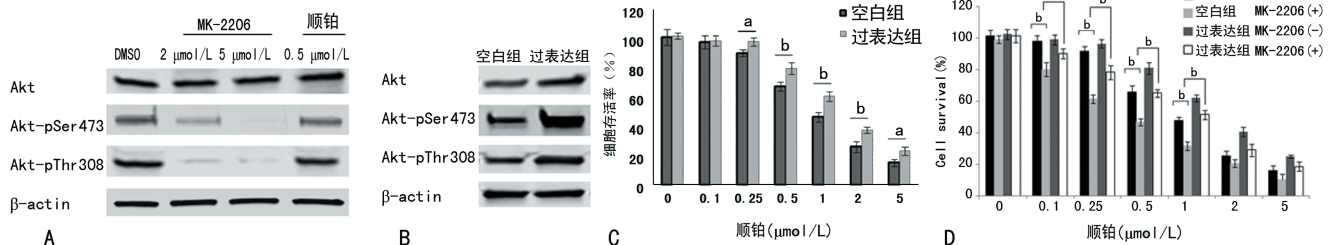
1.35 $\mu\text{mol/L}$, 见图 1。



^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与未添加 MK-2206 或顺铂时比较

图 1 MK-2206 和顺铂对 MDA-MB-468 细胞增殖的影响

2.2 MK-2206 通过抑制 Akt 磷酸化促进顺铂抑制 MDA-MB-468 细胞增殖 2、5 $\mu\text{mol/L}$ MK-2206 均可显著抑制细胞内 Akt Thr308 和 Ser473 的磷酸化(图 2A); 而过表达组活化的 Akt 可显著拮抗顺铂对 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制作用, 与空白组相比, 过表达组 Akt 的过表达使顺铂对 MDA-MB-468 细胞的 IC_{50} 从 1.12 $\mu\text{mol/L}$ 提高到 1.75 $\mu\text{mol/L}$ (图 2B、C)。2 $\mu\text{mol/L}$ MK-2206 与 0~10 $\mu\text{mol/L}$ 梯度浓度顺铂联合应用可促进顺铂对 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制; 但过表达组活化的 Akt 可部分抵消 MK-2206 对顺铂抑制 MDA-MB-468 细胞增殖的促进作用(图 2D)。



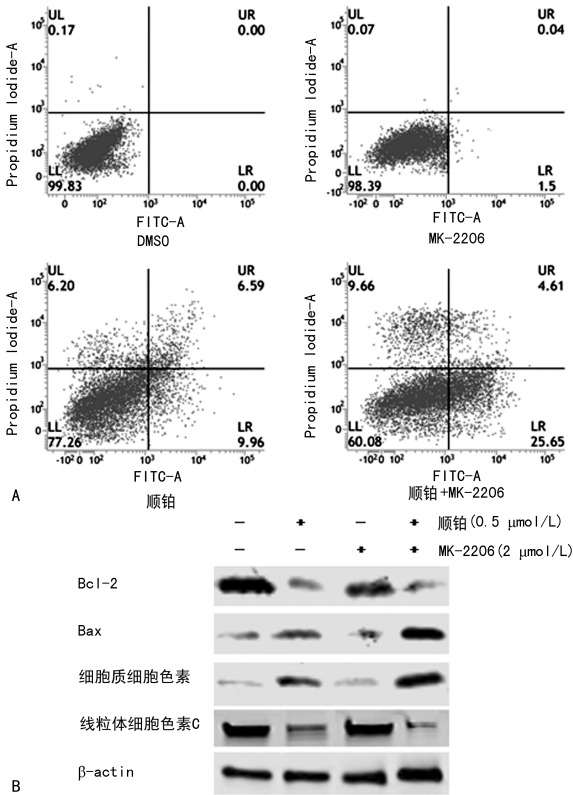
A、B: Western blot 检测细胞内 Akt 磷酸化水平; C: CCK-8 法检测过表达组成性激活 Akt 对顺铂抑制 MDA-MB-468 细胞增殖作用的影响; D: CCK-8 法检测过表达组成性激活 Akt 对顺铂单独或联合 2 $\mu\text{mol/L}$ MK-2206 抑制 MDA-MB-468 细胞增殖作用的影响。^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$

图 2 MK-2206 与顺铂联合应用对 MDA-MB-468 细胞增殖的影响

2.3 MK-2206 促进顺铂诱导的 MDA-MB-468 细胞凋亡 AnnexinV/PI 检测结果显示, 2 $\mu\text{mol/L}$ MK-220 不能诱导 MDA-MB-468 细胞凋亡, 但可显著促进 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂诱导的细胞凋亡(图 3A)。Western blot 结果表明, 2 $\mu\text{mol/L}$ MK-2206 与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂联合处理导致 MDA-MB-468 细胞内 Bax 蛋白和细

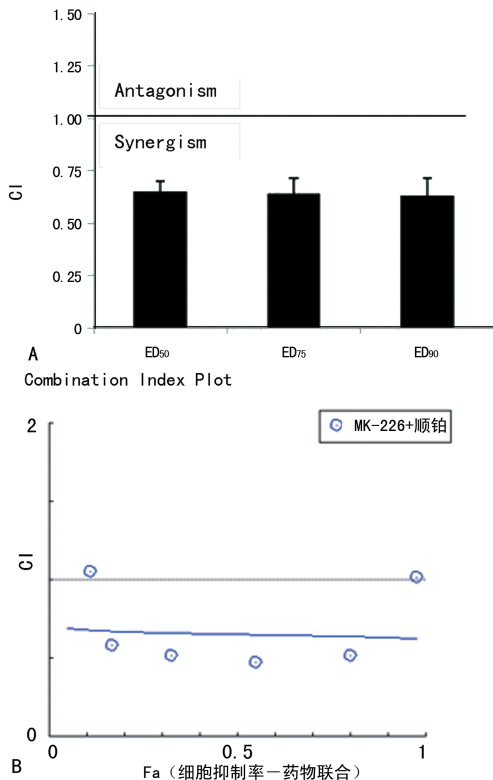
胞质细胞色素 C 表达显著上升, 而 Bcl-2 蛋白和线粒体细胞色素 C 表达显著下调(图 3B)。

2.4 MK-2206 与顺铂协同抑制 MDA-MB-468 细胞增殖 MK-2206 与顺铂的半数有效剂量(50% effective dose, ED_{50})、 ED_{75} 和 ED_{90} 时的 CI 值分别为 0.65 ± 0.05 、 0.64 ± 0.07 和 0.63 ± 0.08 , 均小于 1, 见图 4。



A: Annexin V/PI 双染法进行细胞凋亡分析; B: Western blot 检测 MDA-MB-468 细胞内 Bcl-2、Bax 蛋白表达和细胞质、细胞线粒体内细胞色素 C 水平

图 3 MK-2206 和顺铂联合应用对 MDA-MB-468 细胞凋亡及凋亡相关蛋白的影响



A: MK-2206 和顺铂在 ED₅₀、ED₇₅ 和 ED₉₀ 时的 CI; B: MK-2206 和顺铂联合应用的 CI 值分布图 (CompuSyn 2.0 软件分析)

图 4 MK-2206 和顺铂联合应用抑制 MDA-MB-468 细胞增殖的协同效应分析

3 讨论

大量研究表明, Akt 作为一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在肿瘤细胞信号转导中发挥重要作用, 其可通过下游信号蛋白分子 mTOR、P21 等调控细胞增殖、凋亡自噬和能量代谢, 是近年来抗肿瘤研究的重要靶点^[11]。如前所述, Akt 蛋白激酶的过度活化也是导致三阴性乳腺癌发生发展的重要因素。2016 年以来, MA 等^[12]将 Akt 抑制剂 MK-2206 与雌激素受体抑制剂 fulvestrant 联合用于 ER 阳性和 Her-2 阴性乳腺癌的临床研究, 发现可有效促进 fulvestrant 诱导的 ER 阳性和 Her-2 阴性乳腺癌细胞凋亡, 但将 MK-2206 与芳香化酶抑制剂 Anastrozole 联合用于 ER 阳性和 Her-2 阴性乳腺癌临床研究并未取得良好的治疗效果^[13]。

顺铂是目前临床广泛应用的基础抗三阴性乳腺癌化疗药物之一, 但毒副作用较大且长期应用易导致化疗抵抗效应产生^[14]。本研究首先观察了 MK-2206 对人三阴性乳腺癌 MDA-MB-468 细胞增殖的影响, 结果发现, MK-2206 能够抑制人三阴性乳腺癌 MDA-MB-468 细胞增殖, 同时较低浓度 (2 μmol/L) MK-2206 可显著抑制 Akt 磷酸化水平并显著促进顺铂对 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制作用。

研究表明, Akt 激酶活化时发生 473 位丝氨酸和 308 苏氨酸磷酸化, 而通过将这两个位点的氨基酸突变成天冬氨酸能够模拟 Akt 磷酸化, 从而获得组成性活化的 Akt 用于其功能研究^[15]。为分析 MK-2206 是否通过抑制 Akt 磷酸化发挥作用, 实验中在 MDA-MB-468 细胞中过表达组成性活化的 Akt, 然后首先检测了 Akt 磷酸化对顺铂抗细胞增殖作用的影响, 结果发现表达组成性活化的 Akt 可将顺铂对 MDA-MB-468 细胞的 IC₅₀ 上调, 拮抗其对 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制作用。进一步以 2 μmol/L MK-2206 与顺铂联合应用发现, MK-2206 能够促进顺铂对人三阴性乳腺癌 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制作用, 但过表达组成性活化的 Akt 可部分逆转这一作用。这一结果表明, MK-2206 通过抑制 Akt 磷酸化促进顺铂对 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制。

AnnexinV/PI 细胞凋亡分析发现, 2 μmol/L MK-2206 不能诱导 MDA-MB-468 细胞凋亡, 但能够显著促进顺铂诱导的 MDA-MB-468 细胞凋亡。通过进一步检测 MDA-MB-468 细胞内凋亡相关基因发现, MK-2206 能够显著促进顺铂诱导的 Bax 蛋白表达下调和 Bcl-2 蛋白表达上调, 同时其也促进了顺铂诱导的线粒体膜内侧细胞色素 C 发生细胞质转移。由于 Akt 激酶活性过度活化是肿瘤细胞拮抗细胞凋亡的重要因素, MK-2206 抑制 Akt 激酶磷酸化是其促进顺铂诱导细胞凋亡的主要原因。进一步进行药物联合效应分析显示, MK-2206 和顺铂能够在较低的作用浓度下 (ED₅₀) 显示出抗 MDA-MB-468 细胞增殖的药物协同作用。这一结果提示, 使用 MK-2206 抑制

Akt 有望降低顺铂抗三阴性乳腺癌治疗的有效浓度,从而减少顺铂的毒副作用和化疗耐药的发生。

综上所述, MK-2206 通过抑制 Akt 激酶促进顺铂诱导的线粒体途径细胞凋亡, 并与顺铂通过药物协同作用抑制 MDA-MB-468 细胞增殖。上述研究表明, MK-2206 与顺铂联合应用具有潜在的抗三阴性乳腺癌临床应用价值。

参考文献

- [1] FOULKES W D, SMITH I E, FEIS-FILHO J S. Triple-negative breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(20): 1938-1948.
- [2] VON MINCKWITZ D, PROCTER M, DE AZAMBUJA E A, et al. Adjuvant pertuzumab and trastuzumab in early HER2-positive breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(2): 122-131.
- [3] PICCART-GEBHART M, HOLMES E, BASELGA J, et al. Adjuvant lapatinib and trastuzumab for early human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: results from the randomized phase III adjuvant lapatinib and/or trastuzumab treatment optimization trial[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(10): 1034-1042.
- [4] MAYER I A, ARTEAGA C L. The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment[J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67(1): 11-28.
- [5] HAHNE C, JENS B, HONIG A, et al. The PI3K/AKT/mTOR-signal transduction pathway as drug target in triple-negative breast cancer[J]. *Clin Cancer Drugs*, 2017, 4(1): 47-58.
- [6] LARA J, LONGMATE J, MACK P C, et al. Phase II study of the AKT inhibitor MK-2206 plus erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer who previously progressed on erlotinib[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(19): 4321-4326.
- [7] TOLCHER A W, PATNAIK A, PAPADOPOULOS K P, et al. Phase I study of the MEK inhibitor trametinib in combina-

tion with the AKT inhibitor afuresertib in patients with solid tumors and multiple myeloma[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 75(1): 183-189.

- [8] GODUGU C, DODDAPANENI R, SINGH M. Honokiol nanomicellar formulation produced increased oral bioavailability and anticancer effects in triple negative breast cancer (TNBC)[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 153: 208-219.
- [9] 焦明文, 袁凯, 王玉龙, 等. MK-2206 逆转 MCF-7/ADR 阿霉素耐药作用的初步探讨[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(11): 1494-1500.
- [10] CHOU T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440-446.
- [11] FAES S, DORMOND O. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 21138-21152.
- [12] MA C X, SANCHEZ C, GAO F, et al. A phase I study of the AKT inhibitor MK-2206 in combination with hormonal therapy in postmenopausal women with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(11): 2650-2658.
- [13] MA C X, SUMAN V, GOETZ M P, et al. A phase II trial of neoadjuvant MK-2206, an AKT inhibitor, with anastrozole in clinical stage II or III PIK3CA-Mutant ER-Positive and HER2-Negative breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(22): 6823-6832.
- [14] HU X C, ZHANG J, XU B H, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus paclitaxel plus gemcitabine as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (CBC-SG006): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(4): 436-446.
- [15] DIMMELER S, FLEMING I, FISSLTHALER B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation[J]. *Nature*, 1999, 399(6736): 601-605.

(收稿日期: 2018-05-18 修回日期: 2018-06-16)

(上接第 3857 页)

- microspheres[J]. *Iran J Pharm Res*, 2016, 15(Suppl): 205-211.
- [5] YUAN W, LIU Z. Controlled-release and preserved bioactivity of proteins from (self-assembled) core-shell double-walled microspheres[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012(1): 7: 257-270.
- [6] 余巍巍, 杨新官. 哮喘大鼠肺内神经生长因子的表达变化及与病理改变的关系[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2012, 33(1): 65-67.
- [7] 余巍巍, 陈峰, 罗森. 神经生长因子对哮喘大鼠气道炎症中 TNF- α 表达的调节作用[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(17): 3301-3303.
- [8] LIU Y, ZHANG B, ZHANG S, et al. Nerve growth factor mediated SH2-Bbeta/Akt signal pathway activated in allergic airway challenge in mice[J]. *Respirology*, 2010, 15(1): 80-87.

- [9] FREUND V, PONS F, JOLY V, et al. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions[J]. *Eur Respir J*, 2002, 20(2): 458-463.
- [10] HANF Y, THURECHTK J, WHITTAKER K, et al. Bioerodable PLGA-based microparticles for producing sustained-release drug formulations and strategies for improving drug loading[J]. *Front Pharmacol*, 2016(7): 185.
- [11] JIANG W, GUPTA R K, DESHPANDE M C, et al. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticle for injectable delivery of vaccine antigens[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(3): 391-410.
- [12] 王世寿, 武刚. 肺部缓释微球治疗肺部疾病的性能及评价[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(12): 2241-2248.

(收稿日期: 2018-05-18 修回日期: 2018-06-26)