

以成纤维细胞生长因子受体 1 为靶点的姜黄素类似物的抗肿瘤活性研究

姜程曦^{1,2}, 宋 娇², 林良义², 李校堃^{2*}, 张 颖², 叶清清², 张亚利^{1,2}

1. 池州市九华山黄精研究所, 安徽 池州 242811

2. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325035

摘要: **目的** 寻找以成纤维细胞生长因子受体 1 (FGFR1) 为靶点, 并具有良好的抗肿瘤活性的小分子抑制剂。**方法** 通过改造单羰基姜黄素类似物 3,5-双(2-氟苯亚甲基)哌啶-4-酮 (EF24), 合成了其类似物 [3,5-双(2-溴苯亚甲基)哌啶-4-酮, B6]; 采用 FGFR1 酪氨酸激酶实验验证其靶向性; MTT 法检测 EF24 和 B6 对正常人肝细胞 HL7702、4 种肿瘤细胞 (人大细胞肺癌 NCI-H460、人胃癌细胞 SGC-7901、人小细胞肺癌 A549、人星形胶质瘤细胞株 U251) 增殖的影响; Western blotting 法检测 B6 (2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 对 NCI-H460 细胞 bFGF/FGFR 下游信号蛋白表达的影响; Caspase-3 试剂盒检测 Caspase-3 因子的表达。**结果** EF24 类似物 B6 可以以 FGFR1 为靶点, 抑制 NCI-H460 细胞 FGFR1 以及下游信号蛋白丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT) 和细胞外调节蛋白 (ERK1/2) 的磷酸化, 抑制肿瘤细胞的增殖, 促进细胞凋亡。**结论** 成功改造并获得靶向 FGFR1 的 EF24 类似物 B6, 其具有良好的体外抗肿瘤活性, 为寻找 FGFR1 抑制剂候选抗肿瘤药物提供新思路。

关键词: 成纤维细胞生长因子受体 1; 单羰基姜黄素类似物; 3,5-双(2-氟苯亚甲基)哌啶-4-酮 (EF24); 3,5-双(2-溴苯亚甲基)哌啶-4-酮 (B6); 抗肿瘤; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)16-2434-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.16.016

Study on anti-tumor activity of curcumin analogues with FGFR1 as target

JIANG Cheng-xi^{1,2}, SONG Jiao², LIN Liang-yi², LI Xiao-kun², ZHANG Ying², YE Qing-qing², ZHANG Ya-li^{1,2}

1. Jiuhua Mountain Research Institute of Polygonatum, Chizhou 242811, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

Abstract: **Objective** To search for the small molecule inhibitor with anti-tumor activity by fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) as target. **Methods** The analogue B6 of EF24 was obtained by reforming mono carbonyl curcumin analogues and applied to identifying the target with FGFR1 kinase activity assay. The effect of EF24 and its analogue B6 on the proliferation of HL7702 in normal human and four tumor cells, such as NCI-H460, SGC-7901, A549, and U251; With the concentration of 2.5, 5, and 10 $\mu\text{mol/L}$, B6 was used to investigate the phosphorylation inhibition of bFGF/FGFR downstream signal protein expression in NCI-H460 cells and Caspase-3 factor expression. **Results** With the FGFR1 as target, B6 could inhibit the phosphorylation of FGFR1 in NCI-H460 cells, AKT, and ERK1/2; It also could inhibit the proliferation of cancer cells and promote cell apoptosis. **Conclusion** The analogue B6 of EF24 is obtained from the leading compound EF24 with *in vitro* anti-tumor effect, which provides the basis of looking for the candidate anti-tumor drugs of FGFR1 inhibitor.

Key words: fibroblast growth factor receptor 1; mono carbonyl curcumin analogues; EF24; B6; antitumor; apoptosis

成纤维细胞生长因子受体 (fibroblast growth factor receptors, FGFR) 是酪氨酸激酶受体家族中的一员, bFGF/FGFR 信号转导在促进肿瘤细胞有丝分裂和肿瘤血管生成过程中起着重要的作用, 与肿瘤的发生发展密切相关^[1]。研究表明, FGFR 在多

种肿瘤细胞中高表达, 如肺癌^[2]、胰腺癌^[3]、乳腺癌^[4]、肝癌^[5]、头颈癌^[6]和黑色素瘤^[7], 促进了肿瘤细胞的增殖分裂、肿瘤血管的生成以及肿瘤的浸润转移^[8]。因此以 FGFR 为靶点的抗肿瘤药物开发成了靶向肿瘤治疗药物研发的热点。

收稿日期: 2015-04-04

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目 (2011BAI04B04); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY15H280014)

作者简介: 姜程曦 (1971—), 男, 安徽青阳人, 副研究员, 博士, 研究方向为中药学。Tel: 18969715696 E-mail: jiangchengxi@126.com

*通信作者 李校堃, 男, 陕西富平人, 博士生导师, “长江学者”特聘教授, 研究方向为基因工程蛋白药物的基础研究、工程技术和新药研发、临床应用和转化医学研究。Tel: (0577)86699891 E-mail: xiaokunli@163.net

姜黄素是姜黄、郁金和莪术中的主要活性成分^[9], 研究显示, 姜黄素可以被用于预防和治疗肿瘤^[10], 但其结构中的 β -二酮基团导致其存在化学结构不稳定且体内代谢快等缺点, 严重影响了姜黄素临床上的进一步应用^[11]。因此, 对姜黄素进行结构改造研究具有重要现实意义^[12]。研究发现 3,5-双(2-氟苯亚甲基)哌啶-4-酮 (EF24, 图 1) 为一种人工合成不含 β -二酮结构的单羰基姜黄素类似物, 其活性远远高于姜黄素^[13], 并在体内外都显示出良好的抗肿瘤作用^[14]。但 EF24 在体内抗肿瘤作用的确切靶点仍不明确。本课题组前期深入研究了 EF24 对 FGFR1 酪氨酸激酶的抑制活性, 发现其半数抑制浓度 (IC_{50}) 达到 14 $\mu\text{mol/L}$, 由于其对激酶有效抑制浓度较大, 尚未达到理想值。因此, 以 EF24 为先导化合物, 对其进行合理的结构改造获得了 3,5-双(2-溴苯亚甲基)哌啶-4-酮, B6, 图 1], 本实验进一步比较 EF24 和 B6 体外抗肿瘤活性, 并探讨其抗肿瘤活性与碱性成纤维生长因子 (bFGF) /FGFR 信号通路的关系, 为寻找具有抗肿瘤作用的高效低毒姜黄素类似物提供依据。

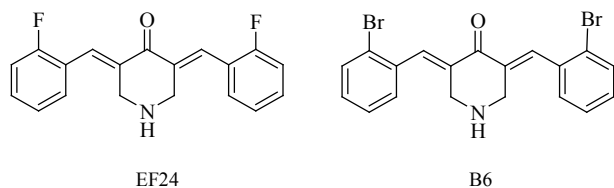


图 1 EF24 及其类似物 B6 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of EF24 and its analogue B6

1 材料

1.1 细胞株

正常人肝细胞 HL7702、4 种肿瘤细胞 (人大细胞肺癌 NCI-H460、人胃癌细胞 SGC-7901、人小细胞肺癌 A549、人星形胶质瘤细胞株 U251) 均购买于中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.2 试剂

胎牛血清, Gibco 公司; p-FGFR1 (Tyr 653/654) 抗体购买于 Cell Signal Technology 公司; 磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 [p-AKT (Ser473)], 磷酸化细胞外调节蛋白 (p-ERK1/2)、成纤维细胞生长因子受体 1 (FGFR1)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT)、细胞外调节蛋白 (ERK) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 均购买于 Santa Cruz 公司;

Caspase-3 试剂盒购买于碧云天生物技术有限公司。4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液 (HEPES)、十二烷基聚乙二醇醚 (Brij-35)、二硫苏糖醇 (DTT)、羧基荧光素 (FAM)、四乙酸乙二胺 (EDTA) 和氯化镁 (MgCl_2) 均购买于 Sigma 公司。

1.3 药物

EF24 (质量分数大于 98%, 批号 B434770) 购买于百灵威公司; *N*-[2-[[4-(二乙基氨基)丁基]氨基]-6-(3,5-二甲氧基苯基)吡啶并[2,3-*D*]嘧啶-7-基]-*N'*-叔丁基脒 (PD173074, 质量分数 99.61%, 批号 S126404) 购买于 Selleck 公司; B6 自制, 质量分数大于 98%。

1.4 仪器

EnVision[®] Multilabel Reade (PerkinElmer); 倒置显微镜 (日本尼康); Spectra Max M2 多功能酶标仪 (Molecular Devices); 凝胶成像系统 (Bio-rad)。

2 方法

2.1 FGFR1 酪氨酸激酶抑制活性检测

采用 Caliper Mobility Shift Assay 方法检测酪氨酸激酶抑制活性, 该方法是以微流体芯片技术的迁移率检测技术为核心的检测系统。首先配制 1.25 $\times$ 激酶反应缓冲液 (62.5 mmol/L HEPES, pH 7.5; 0.001 875% Brij-35; 12.5 mmol/L MgCl_2 ; 2.5 mmol/L DTT) 和激酶反应终止液 (100 mmol/L HEPES, pH 7.5; 0.015% Brij-35; 0.2% Coating Reagent #3); 在 5 μL 的不同浓度的化合物溶液 (用 DMSO 溶解, 用水稀释 10 倍) 中加入 10 μL 的 2.5 $\times$ FGFR1 激酶溶液 (在 1.25 $\times$ 激酶反应缓冲液中加入激酶), 室温孵育 10 min 后再加入 10 μL 的 2.5 $\times$ 底物肽溶液 (在 1.25 $\times$ 激酶反应缓冲液中加入 FAM 标记肽和 ATP), 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下反应特定时间后加入 25 μL 激酶反应终止液。在 Caliper 上测试荧光度 (F), 计算激酶活性抑制率。以 DMSO 为溶剂对照, 以不加激酶为阴性对照。测定 IC_{50} 时每种样品设 5 个稀释度 (0.01、0.1、1.0、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 各 3 个复孔, 重复 3 次实验。

$$\text{激酶活性抑制率} = (F_{\text{DMSO 对照}} - F_{\text{样品}}) / (F_{\text{DMSO 对照}} - F_{\text{阴性对照}})$$

2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制活性

HL7702、NCI-H460、SGC-7901、A549、U251 细胞均为贴壁生长, U251 使用 DMEM 高糖培养基, 其他细胞均使用 RPMI 1640 培养基, 培养基中均含有 10% 胎牛血清和 1% 的青-链霉素。细胞于恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中培养。用

含 EDTA 的胰酶消化处于对数期生长的细胞,离心,各取 HL7702、NCI-H460、SGC-7901、A549 和 U251 细胞悬液 100 μL 接种于 96 孔板 (每孔细胞数约 3 000 个),用含有 10%胎牛血清的完全培养基进行培养,待细胞贴壁过夜后换液加药。设置空白组、阴性对照 (DMSO) 组、阳性对照 EF24 (10/27、10/9、10/3、10、30 $\mu\text{mol/L}$) 组和受试药 B6 (10/27、10/9、10/3、10、30 $\mu\text{mol/L}$) 组,每组 3 个复孔。药物作用 72 h 后,观察细胞存活情况,并在每孔各加入 25 μL MTT (5 mg/mL) 溶液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 4 h 以上,弃上清,用 DMSO 溶解结晶,室温下避光振荡 10 min,在酶标仪 490 nm 处读取吸光度 (A) 值,计算细胞增殖抑制率,计算 IC_{50} 值。

增殖抑制率 = (加药组 A 平均值 - 空白组 A 平均值) / (阴性对照组 A 平均值 - 空白组 A 平均值)

2.3 Western blotting 检测 bFGF/FGFR 下游信号蛋白表达

用含 EDTA 的胰酶消化处于对数期生长的 NCI-H460 细胞,并离心,取细胞悬液接种于六孔板 (4×10^5 个/孔),用含有 10%胎牛血清的完全培养基进行培养,待细胞贴壁过夜后换饥饿培养基 (不含胎牛血清) 饥饿作用 24 h,加药,设置阴性对照 (DMSO) 组、DMSO+bFGF 组、bFGF+EF24 (2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 组和 bFGF+B6 (2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 组,药物作用 1 h, bFGF 终质量浓度为 30 ng/mL,刺激 10 min 后收蛋白。考马斯亮蓝测定细胞总蛋白浓度,配置上样缓冲液,蛋白凝胶电泳后敷一抗 (p-FGFR1、p-AKT、p-ERK1/2、FGFR1、AKT、ERK2 和参比 GAPDH),室温摇床 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜后 TBST 洗一抗,二抗室温摇床 1 h 后 TBST 洗二抗,凝胶成像仪显色。

2.4 Caspase-3 试剂盒检测 Caspase-3 因子的表达

取对数期生长的 NCI-H460 细胞悬液铺于 60 mm 的皿中 (1×10^6 个/皿),含有 10%胎牛血清的完全培养基贴壁过夜后换液加药,设置阴性对照 (DMSO) 组、EF24 (5 $\mu\text{mol/L}$) 组和 B6 (5 $\mu\text{mol/L}$) 组,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱作用 12 h;用胰酶消化贴壁细胞,并收集至备用的细胞液中。 $600 \times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 收集细胞,除上清,PBS 重悬,加入裂解液,重悬沉淀,水浴裂解 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、16 000~20 000 $\times g$ 离心 10~15 min,把上清转移到冰浴预冷的离心管中,用考马斯亮蓝法测定样品蛋白浓

度,使蛋白的质量浓度达到 1~3 mg/mL;同时测定游离硝基苯胺 (pNA) 标准曲线;根据 Caspase-3 试剂盒说明书检测蛋白样品中其酶的活性 (以 GAPDH 为参比蛋白),并计算 1 个样品单位质量蛋白中所含的 Caspase-3 的酶活力单位。

2.5 统计学方法

所有实验数据均来自 3 次重复实验,并输入 GraphPad Prism 5.0 统计软件包进行统计分析。

3 结果

3.1 对 FGFR1 酪氨酸激酶的抑制活性

从激酶活性的结果 (表 1) 看,FGFR 抑制剂 PD173074 对 FGFR1 酪氨酸激酶抑制作用的 IC_{50} 值为 2.9×10^{-3} $\mu\text{mol/L}$;溴取代的 EF24 类似物 B6 表现出很好的抑制活性,对于 FGFR1 酪氨酸激酶的 IC_{50} 为 8.1 $\mu\text{mol/L}$,较先导化合物 EF24 ($\text{IC}_{50}=14$ $\mu\text{mol/L}$) 抑制效果有明显提高和改善,推测有可能化合物中的卤素与蛋白形成卤键的强弱不同,使得化合物与 FGFR1 的结合能力有差异。

表 1 EF24 及其类似物 B6 的 FGFR1 酪氨酸激酶抑制活性
Table 1 Inhibition of EF24 and its analogue B6 on FGFR1 kinase activity

化合物	对 FGFR1 酪氨酸激酶的 $\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
EF24	14
B6	8.1
PD173074	2.9×10^{-3}

3.2 对多种肿瘤细胞的增殖抑制活性

表 2 为先导化合物 EF24 及其类似物 B6 对正常细胞 HL7702 及 4 种肿瘤细胞 NCI-H460、SGC-7901、A549 及 U251 的 IC_{50} 值,药物作用时间为 72 h。从表 2 中可以看出 EF24 及其类似物 B6 对 4 种肿瘤细胞的 IC_{50} 值均达到微摩尔级别,但是 EF24 类似物 B6 对正常肝细胞 HL7702 的抑制作用较弱,表现出较弱的细胞毒性作用,相对 EF24 有较高的安全性。从结果还发现类似物 B6 对 NCI-H460 的 IC_{50} 值相对其他肿瘤细胞要低很多,说明 EF24 类似物 B6 对 NCI-H460 的增殖抑制具有很好的细胞选择性。

3.3 对肿瘤细胞 NCI-H460 中 FGFR1 及下游信号 AKT、ERK1/2 活化的抑制活性

为了进一步探索 EF24 类似物 B6 对 FGFR1 的作用机制,在肿瘤细胞 NCI-H460 中检测其对 FGFR1 活化的影响,EF24 或 B6 作用细胞 1 h 后,

表 2 EF24 及其类似物 B6 的细胞增殖抑制活性

Table 2 Inhibitory activity of EF24 and its analogue B6 on cell proliferation

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)				
	HL7702	NCI-H460	A549	SGC-7901	U251
EF24	5.30±1.10	3.21±1.03	4.08±0.42	6.21±1.50	0.83±0.29
B6	19.05±1.20	1.09±0.24	8.95±1.22	2.88±0.92	2.63±0.21

加 bFGF 刺激 10 min, 采用 Western blotting 技术检测。图 2 结果显示, B6 对 NCI-H460 中 FGFR1 及其下游信号分子 AKT 及 ERK1/2 活化有明显抑制作用, 并且抑制效果较先导化合物 EF24 好。且随着化合物浓度的增加 (2.5、5.0、10.0 μmol/L), 对 FGFR1 及其下游信号分子 AKT 及 ERK1/2 活化的抑制作用逐渐增强, 表现出很好的剂量依赖性。上述结果进一步证明了 EF24 类似物 B6 确实是通过阻断 bFGF/FGFR1 通路起作用的。

3.4 对肿瘤细胞 NCI-H460 细胞的促凋亡作用

从图 3 可以看出 5 μmol/L B6 作用于 NCI-H460 细胞 12 h 后能有效地诱导 Caspase-3 的表达, 且强于先导化合物 EF24。凋亡蛋白 Caspase-3 酶的活性较阴性对照组有明显增强。

4 讨论

FGFR1 是 FGFR 家族中的一员, 该家族中另外 3 个成员分别为 FGFR2、FGFR3、FGFR4^[15], 均能被 bFGF 激活, 从而激活细胞内相关信号通路, 对细胞增殖信号通路的激活有重要意义。据报道很多

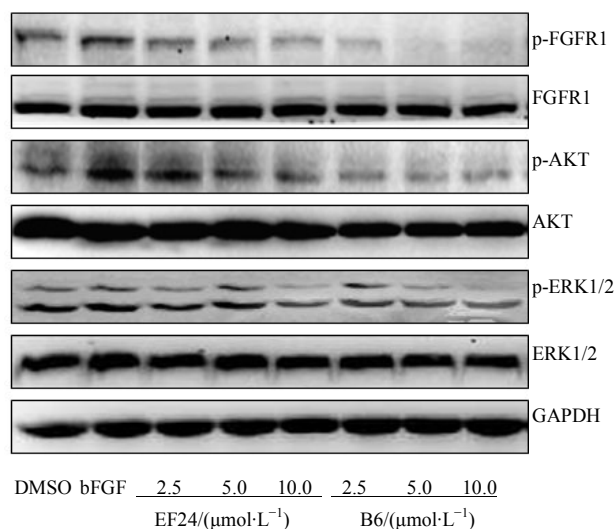


图 2 EF24 及其类似物 B6 对 NCI-H460 细胞中 FGFR1 信号通路的抑制作用

Fig. 2 Effect of EF24 and its analogue B6 on inhibiting FGFR1 signaling in NCI-H460 cells

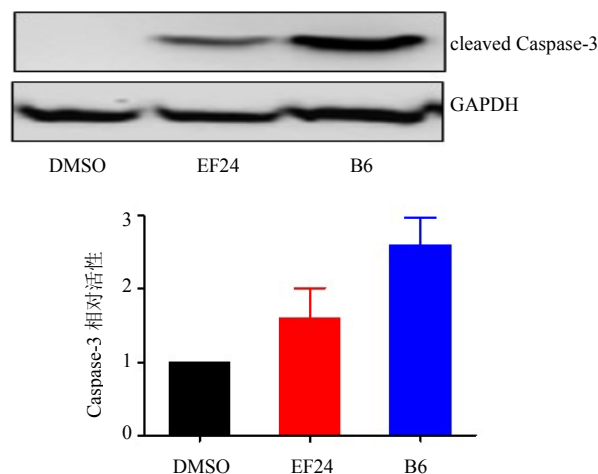


图 3 EF24 及其类似物 B6 对 NCI-H460 细胞的促凋亡作用
Fig. 3 Apoptosis-promoting effect of EF24 and its analogue B6 on NCI-H460 cells

肿瘤细胞 (H460、A549、SGC7901 和 U251) 中由于 FGFR 的高表达从而导致细胞恶性增殖^[16-19]。因此通过阻断肿瘤细胞内 bFGF/FGFR1 信号通路已经成为治疗某些肿瘤的靶点之一。人工合成的单羧基姜黄素类似物 EF24 对结肠癌和卵巢癌等都具有良好的体内外抗肿瘤活性^[14], 但由于其体内靶点不明确, 因此以 EF24 为先导化合物设计并获得其结构类似物 B6, 通过体外 FGFR1 酪氨酸激酶抑制活性实验验证了 B6 可以抑制 FGFR1 酪氨酸激酶活性, 因此将其进行进一步的体外抗肿瘤活性研究。

在体外抗肿瘤活性实验中, 发现 EF24 类似物 B6 有效地抑制了多种肿瘤细胞的增殖, 并且对 NCI-H460 有较好的选择性, 且具有很高的安全性。细胞内信号分子检测发现 EF24 类似物 B6 对 bFGF/FGFR 信号通路中 FGFR1 以及下游信号蛋白 AKT 和 ERK1/2 的活化具有很强的抑制作用, 并呈现出良好的剂量依赖性, 因此表明该类似物 B6 不仅可以抑制 FGFR1 激酶的活性, 同时还可以抑制 bFGF/FGFR 信号通路中 FGFR1 以及下游的信号蛋白 AKT 和 ERK1/2 的活化, 说明了类似物 B6 确实是 FGFR1 的抑制剂。进一步 Western blotting 实验结

果表明 B6 能有效地诱导 Caspase-3 的表达, 同时 Caspase-3 试剂盒的检测结果也进一步验证了这一点。

通过先导物 EF24 设计改构获得的类似物 B6 体外对多种肿瘤细胞有增殖抑制作用, 尤其是对 NCI-H460 细胞; 对 FGFR1 激酶有很好的抑制活性, 也能明显抑制了 FGFR1 及下游增殖信号蛋白 AKT 及 ERK1/2 的活化, 促进肿瘤细胞的凋亡, 其效果较先导化合物有明显提高和改善, 并具有更好的安全性。证明了以 EF24 为先导化合物合成靶向 FGFR1 的小分子抑制剂的思路是可行的, 并具有很好的研发前景。

参考文献

- [1] Fiorio Pla A, Maric D, Brazer S C, *et al.* Canonical transient receptor potential 1 plays a role in basic fibroblast growth factor (bFGF)/FGF receptor-1-induced Ca^{2+} entry and embryonic rat neural stem cell proliferation [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(10): 2687-2701.
- [2] Volm M, Koomagi R, Mattern J, *et al.* Prognostic value of basic fibroblast growth factor and its receptor (FGFR-1) in patients with non-small cell lung carcinomas [J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(4): 691-693.
- [3] Ohta T, Yamamoto M, Numata M, *et al.* Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in human pancreatic carcinomas [J]. *Br J Cancer*, 1995, 72(4): 824-831.
- [4] Yiangou C, Gomm J J, Coope R C, *et al.* Fibroblast growth factor 2 in breast cancer: occurrence and prognostic significance [J]. *Br J Cancer*, 1997, 75(1): 28-33.
- [5] Wang J, Su H, Han X, *et al.* Inhibition of fibroblast growth factor receptor signaling impairs metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(11): 11005-11011.
- [6] Dellacono F R, Spiro J, Eisma R, *et al.* Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors by head and neck squamous carcinoma tumor and vascular endothelial cells [J]. *Am J Surg*, 1997, 174(5): 540-544.
- [7] Knights V, Cook S J. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 125(1): 105-117.
- [8] Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(2): 179-186.
- [9] Taylor R A, Leonard M C. Curcumin for inflammatory bowel disease: a review of human studies [J]. *Altern Med Rev*, 2011, 16(2): 152-156.
- [10] Bansal S S, Goel M, Aqil F, *et al.* Advanced drug delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011, 4(8): 1158-1171.
- [11] Anand P, Kunnumakkara A B, Newman R A, *et al.* Bioavailability of curcumin: problems and promises [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(6): 807-818.
- [12] 姜程曦, 林良义, 宋 娇, 等. 姜黄素类似物抑制炎症反应缓解 1 型糖尿病肾损伤实验研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(12): 1785-1790.
- [13] Mosley C A, Liotta D C, Snyder J P. Highly active anticancer curcumin analogues [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 595: 77-103.
- [14] Adams B K, Cai J, Armstrong J, *et al.* EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism [J]. *Anticancer Drugs*, 2005, 16(3): 263-275.
- [15] Hatch N E. FGF signaling in craniofacial biological control and pathological craniofacial development [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2010, 20(4): 295-311.
- [16] Armstrong K, Ahmad I, Kalna G, *et al.* Upregulated FGFR1 expression is associated with the transition of hormone-naïve to castrate-resistant prostate cancer [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(9): 1362-1369.
- [17] Ogawa T, Takayama K, Takakura N, *et al.* Anti-tumor angiogenesis therapy using soluble receptors: enhanced inhibition of tumor growth when soluble fibroblast growth factor receptor-1 is used with soluble vascular endothelial growth factor receptor [J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(8): 633-640.
- [18] Ye Y W, Zhou Y, Yuan L, *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation and antiapoptosis during gastric cancer progression [J]. *Cancer*, 2011, 117(23): 5304-5313.
- [19] Fukai J, Yokote H, Yamanaka R, *et al.* EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the human glioma U251 cell line [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(9): 2768-2778.