

双吡啶马来酰亚胺衍生物 L6 诱导白血病细胞凋亡机制的研究

陈娟^{1,2}, 宋佳蕾³, 王立平^{1,2}, 朱伟明^{1,2,4}, 宋晶睿^{1,2}, 饶青^{1,2}, Babu Gajendran^{1,2}, 李艳梅^{1,2*}

1. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014

2. 贵州医科大学药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550014

3. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044

4. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003

摘要: 目的 探讨双吡啶马来酰亚胺衍生物 L6 诱导白血病细胞的凋亡作用及其分子机制。方法 采用 MTT 比色法检测 L6 对白血病细胞 HEL、K562、KG1a 的杀伤作用。流式细胞术检测 L6 对 HEL 细胞凋亡、周期和分化的影响。Western blotting 法检测细胞凋亡相关蛋白的表达。通过体内实验研究 L6 治疗小鼠白血病的作用效果。结果 MTT 比色法结果显示 L6 对 HEL、K562、KG1a 细胞具有比阳性对照米唑妥林 (PKC412) 更显著的抑制活性, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 (0.05±0.03)、(0.32±0.01)、(0.19±0.10) μmol/L。L6 可以诱导 HEL 细胞发生凋亡和 G₂/M 期阻滞, 诱导 HEL 细胞向巨核细胞方向分化, 且呈剂量效应。Western blotting 检测结果表明 L6 主要通过激活 Caspase-3 执行细胞凋亡。小鼠肝组织苏木精-伊红 (HE) 染色显示肝组织内 HEL 细胞浸润有所减轻, 但 L6 组减轻的效果更明显, 表明其可延缓白血病细胞的转移, 且效果优于米唑妥林。结论 双吡啶马来酰亚胺衍生物 L6 有较强的抗白血病活性, 为新型白血病药物的研发提供参考。

关键词: 双吡啶马来酰亚胺; 白血病; MTT; 凋亡; G₂/M 阻滞; 巨核分化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)02-0426-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.020

Study on apoptosis mechanism of leukemia cells induced by bisindolylmaleimide derivative L6

CHEN Juan^{1,2}, SONG Jia-lei³, WANG Li-ping^{1,2}, ZHU Wei-ming^{1,2,4}, SONG Jing-rui^{1,2}, RAO Qing^{1,2}, Babu Gajendran^{1,2}, LI Yan-mei^{1,2}

1. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academic of Sciences, Guiyang 550014, China

2. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China

3. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China

4. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: Objective To investigate the effect of bisindolylmaleimide derivative L6 on inducing apoptosis of leukemia cells and its molecular mechanism. **Methods** MTT assay was used to determinate the killing effect of L6 on HEL, K562, and KG1a cells. Flow cytometry was used to detect the effects of L6 on apoptosis, cell cycle, and differentiation of HEL cells. Western blotting was used to detect the expression of apoptosis-related protein. Finally, the effect of L6 on leukemia mouse was studied *in vivo*. **Results** MTT assay showed that L6 had a stronger inhibitory activity against HEL, K562, and KG1a cell lines than the positive control PKC412 compound, with IC₅₀ of (0.05 ± 0.03), (0.32 ± 0.01), and (0.19 ± 0.10) μmol/L, respectively. L6 could induce the apoptosis, G₂/M arrest, megakaryocyte differentiation of HEL cells with a dose effect. Western blotting revealed that L6 mainly performed apoptosis by activating Caspase-3, which is an apoptotic executive protein. Hematoxylin-eosin (HE) staining of liver tissue of mice showed a reduction in HEL cell infiltration, but the more significant reduction in group L6 was observed, indicating that L6 could delay the metastasis of leukemia, and its effect was better than that of PKC412. **Conclusion** Bisindolylmaleimide derivative L6 has a strong anti-leukemia activity, providing new

收稿日期: 2019-07-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872772); 国家自然科学基金资助项目 (81700169); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2019] 2762); 贵州省百人计划项目

作者简介: 陈娟, 助理研究员, 研究方向为抗白血病天然小分子化合物活性筛选。Tel: 18324159676 E-mail: cjchenao@163.com

*通信作者 李艳梅, 研究员, 研究方向为药物化学。Tel: 13595124235 E-mail: liyanmei518@hotmail.com

hope for the development of new leukemia drugs.

Key words: bisindolylmaleimide; leukemia; inhibitory activity; MTT; apoptosis; G₂/M arrest; megakaryocyte differentiation

癌症已经成为严重威胁人类健康的杀手^[1-5]。白血病是最常见的癌症之一,尤其易发生在儿童和青少年中^[2,6-8]。2000—2011 年,中国白血病患者死亡率上升迅速,其死亡率在儿童和青少年中位于首位^[1-3]。虽然近年来采用了化疗、免疫治疗、靶向治疗、放疗、联合治疗等多种治疗方案,但仍然有绝大多数白血病患者死亡^[8]。米哚妥林(PKC412)是 2017 年美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市的用于治疗 FLT3 型急性髓系白血病(AML)的新药,是首款与化疗联用治疗 AML 的靶向药物。PKC412 是多种激酶抑制剂,能抑制 FMS 样酪氨酸激酶 3 (FLT3)、磷酸烯醇式丙酮酸羧酶(PCK)、C-Fos、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1)、KIT、血管内皮生长因子(VEGF)等多种激酶活性^[9-12]。本课题组在源自海洋的马杜拉属放线菌 *Actinomadura* sp. 007 的发酵物中发现了吲哚咪唑生物碱与 PKC412 结构相似,基于 PKC412 对白血病的良好活性,保留了吲哚咪唑母核结构,对其结构进行修饰,得到一系列双吲哚取代的马来酰亚胺衍生物^[13]。其中化合物 L6 为黄色粉末、相对分子质量为 560,质量分数≥95%,常温下结构稳定。因为和 PKC412 结构的相似性,本课题组合成了质量分数≥95%的 PKC412 作为阳性对照。本实验探索双吲哚马来酰亚胺衍生物 L6 对白血病细胞 HEL、K562、KG1a 的杀伤作用,并研究该化合物对 HEL 细胞作用的分子机制,以期对白血病的治疗和新药研究提供参考。

1 材料

1.1 细胞与动物

人红细胞白血病 HEL 细胞、人慢性粒细胞白血病 K562 细胞、急性髓系白血病 KG1a 细胞均来自加拿大桑尼布鲁克研究中心(Sunnybrook Research Center),由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室保存。NOD/SCID 小鼠,3~4 月龄,共 30 只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号 SCXK(京)2014-0004。无菌颗粒饲料、灭菌超纯水饲养,饲养环境温度稳定在 25 ℃,相对湿度保持在 40%~70%,昼夜交替光照。所有操作符合动物伦理学要求。

1.2 药品与试剂

L6 为本课题组合成,黄色粉末、相对分子质量为 560,质量分数≥95%,常温下结构稳定。阳性对照 PKC412 由本课题组合成,质量分数≥95%。

细胞培养基 RPMI 1640 (Gibco 公司);胎牛血清(FBS, Hyclone 公司);二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、PBS 缓冲液、胰化丙锭 PI 溶液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);凋亡试剂盒、CD41a、CD61、CD235a、CD71 抗体(BD 公司);核糖核酸酶 RNase (Takara 公司);细胞裂解液 RIPA、PMSF、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、Western 转膜液(上海碧云天生物技术有限公司);0.2 μm PVDF 膜(BI 公司);Caspase-3、cleaved Caspase-3、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)、人 B 细胞淋巴瘤-xL (Bcl-xL)、信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3)、p-STAT3、磷酸化的哺乳动物雷帕霉素蛋白(p-mTOR)、GAPDH 抗体(Abcam 公司);荧光二抗(CST 公司);苏木精、丽春红、苯胺蓝、DEPC (Sigma 公司);蛋白免疫印迹成像系统 Imaging System (Li-Cor 公司)。

1.3 仪器

CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Scientific Forma 公司);可调微量移液器 (Eppendorf 公司);台式高速冷冻离心机 (Backman 公司);倒置光学显微镜 (Zeiss 公司);Western 电泳仪 (Bio-Rad 公司);流式细胞仪 (ACEA Biosciences 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与活性筛选

HEL、K562、KG1a 细胞用含 5% FBS 的 RPMI 1640 培养基于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。L6 和 PKC412 用 DMSO 溶解为 20 mmol/L 储存液备用。收集对数生长期的细胞计数后,以 8×10^4 个/孔、每孔 100 μL 的量铺至 96 孔板中,培养 2 h,待其稳定后,K562、HEL、KG1a 细胞中分别加入 L6 0.01、0.05、0.10、0.30、0.50 μmol/L 和 PKC412 0.3、0.5、1.0、3.0、5.0 μmol/L。对照组细胞加入 1 μL DMSO,并设置只有细胞的空白对照组。每个浓度设置 5 个复孔。培养 72 h 后,每孔加入 10 μL 5 mg/mL MTT 继续培养 4 h,2 000 r/min 离心 20 min,去掉上清液,每孔加入 160 μL DMSO,置于恒温摇床上震荡混匀

10 min, 使晶体溶解, 用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 (A) 值。计算出不同浓度 L6 和 PKC412 对每种细胞的增殖抑制率和半数抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 流式细胞仪检测

2.2.1 凋亡检测 取对数生长期 HEL 细胞按 8×10^5 个铺板到 60 mm 培养皿中, 并加入相应浓度的 L6, 使终浓度为 0.10、0.15、0.30、0.50 $\mu\text{mol/L}$, 对照组细胞加入 DMSO, 48 h 后收集细胞, 并用预冷 PBS 清洗 3 次, $200 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 随后加入 100 μL $1 \times$ Binding buffer 混匀, 并加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶 (PI) 避光 4°C 染色 15 min, 然后用流式细胞仪检测分析。

2.2.2 细胞周期检测 L6 加入 60 mm 培养皿中, 终浓度为 0.15、0.30 $\mu\text{mol/L}$, 以 DMSO 作为对照, 用上述方法铺板 HEL 细胞收集后, 用 1 mL 预冷的 70% 无水乙醇 4°C 固定过夜。2 000 r/min 离心 5 min, 并用预冷 PBS 清洗 2 次, 离心后用含 1 $\mu\text{g/mL}$ RNase 和 50 $\mu\text{g/mL}$ PI 的 PBS 混匀, 室温避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测分析。

2.2.3 表面抗原检测 L6 加入 60 mm 培养皿中, 终浓度为 0.1、0.3 $\mu\text{mol/L}$, 以 DMSO 作为对照, 按上述方法铺板 HEL 细胞收集后, 用 100 μL 预冷 PBS 混匀, 分别加入 5 μL $1 \times$ FITC-CD61、 $1 \times$ APC-CD41a 和 5 μL $1 \times$ FITC-CD71、 $1 \times$ APC-CD235a, 4°C 避光孵育 1 h, 用流式细胞仪检测分析。

2.3 蛋白免疫印迹分析

HEL 细胞铺板于 60 mm 培养皿中, 加入 L6 终浓度为 0.01、0.05、0.10、0.15、0.50 $\mu\text{mol/L}$, 以 DMSO 作为对照, 培养 16 h 后收集细胞, 预冷 PBS 清洗 3 次, 加入 80~150 μL 含有 1% PMSF 的细胞裂解液 RIPA, 冰上裂解 30 min, 15 000 r/min 离心 15 min, 去沉淀得到细胞蛋白溶液。用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度, 并用 $5 \times$ loading buffer 按 1:4 混匀, 96°C 变性 5 min, -80°C 保存使用。

10% SDS-PAGE 分离胶中每孔加入 50 μg 蛋白, 待蛋白分离完全后, 转移到 0.2 μm 的 PVDF 膜上后, 5% BSA 室温封闭 1 h, 然后用相应浓度的一抗 4°C 孵育过夜, $1 \times$ TBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 加入荧光二抗, 避光室温孵育 2 h, $1 \times$ TBS 清洗后用蛋白免疫印迹成像系统拍照。

2.4 体内实验

将 33 只小鼠随机分成 4 组, 分别为对照组、模

型组、PKC412 阳性对照组、L6 组, 其中对照组 3 只, 其余组每组 10 只, 经过 1 周的适应后, 制备白血病小鼠模型。收集对数期生长的 HEL 细胞, 用 PBS 清洗 3 次后, 计数稀释至 5×10^6 个/mL, 通过尾 iv 100 μL , 每只小鼠体质量估算为 25 g。造模后的第 2 天开始 ip 给药, 模型组小鼠 ip 100 μL 5% DMSO PBS 稀释溶液, PKC412 和 L6 组以 5 mg/kg 剂量 (根据前期急性毒性实验结果选择剂量), 分别 ip 100 μL PKC412 和 L6 稀释液。隔 1 d 给药 1 次, 连续给药 10 次后, 发现小鼠腹部肿胀严重, 为保证取样具有统计学意义, 每组各取 3 只小鼠, 收集脾脏、肝脏、血液, 并称量脾脏、肝脏的质量后进行 HE 染色, 将血液 200 r/min 离心 20 min 后, 计算红细胞比容。剩余小鼠用于生存曲线实验。

2.5 统计学处理分析

将所有采集的数据用 SPSS 25.0 进行统计分析, 数据结果用 3 个独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据采用 Student t 检验和 P 值分析。

3 结果

3.1 L6 对白血病细胞增殖的影响

不同浓度的 L6 和 PKC412 对 HEL、K562、KG1a 细胞的增殖抑制率见图 1-A。L6 和 PKC412 对不同细胞的 IC_{50} 值见图 1-B, 结果表明 L6 对 HEL、K562、KG1a 细胞的抑制活性明显优于阳性对照 PKC412。不同浓度 L6 对 HEL 细胞的生长曲线如图 1-C 所示, 表明 L6 对 HEL 细胞有剂量依赖和时间依赖的增殖抑制效应。

3.2 L6 对 HEL 细胞凋亡、周期和分化的影响

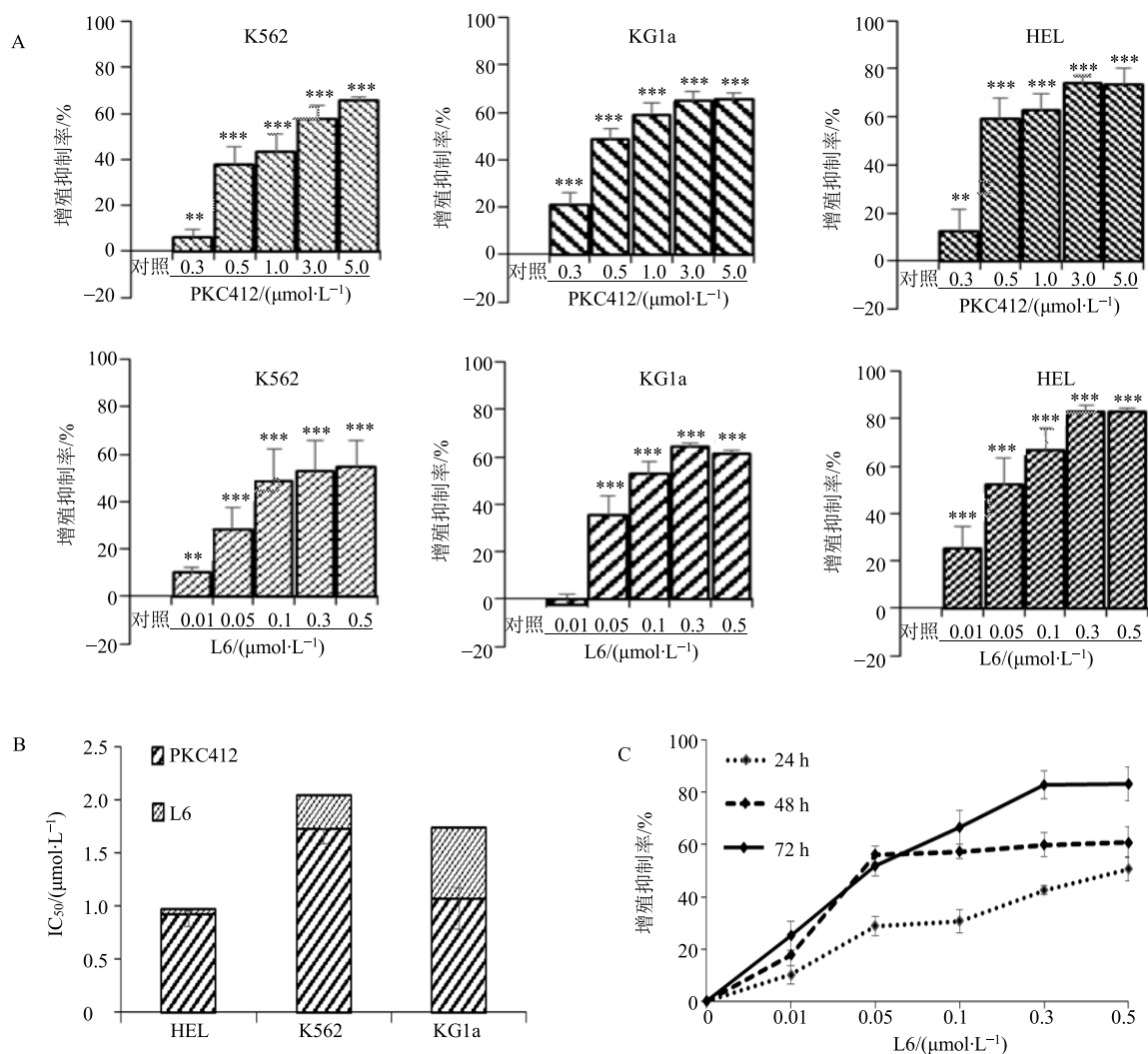
图 2~4 显示不同浓度 L6 对 HEL 细胞凋亡、周期和分化的影响, 结果表明, 与对照组比较, L6 能诱导 HEL 细胞发生凋亡, 使其细胞周期阻滞在 G_2/M 期, 并诱导其向巨核细胞方向分化。

3.3 蛋白免疫印迹分析

如图 5 所示, L6 能促进 Caspase-3 和 PARP 蛋白的裂解 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 并使 Bcl-xL、p-STAT3、p-mTOR 蛋白表达下调 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且呈浓度梯度效应。

3.4 L6 对白血病模型小鼠脾脏、肝脏的影响

脾组织的 HE 染色结果 (图 6) 显示, 与对照组比较, 模型组小鼠脾的正常组织结构被破坏, 有大量的 HEL 细胞浸润。与模型组比较, PKC412 和 L6 组小鼠的 HEL 细胞浸润程度未见明显减轻。肝组织的 HE 染色发现, 模型组小鼠肝组织内可见



A-L6 和 PKC412 处理 HEL、K562、KG1a 细胞 72 h 后的增殖抑制率 B-L6 和 PKC412 对 HEL、K562、KG1a 细胞的 IC₅₀ 值 (作用 72 h)
C-不同浓度的 L6 处理 HEL 细胞后的生长曲线; 与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图 3 同
A-proliferation inhibition rate of HEL, K562, and KG1a cells treated with L6 and PKC412 for 72 h B-IC₅₀ comparison of PKC412 and L6 for HEL, K562, and KG1a cells (72 h) C-growth curve of HEL cells treated with different concentrations of L6; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as figure 3

图 1 L6 和 PKC412 对白血病细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Effect of L6 and PKC412 on proliferation of leukemia cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

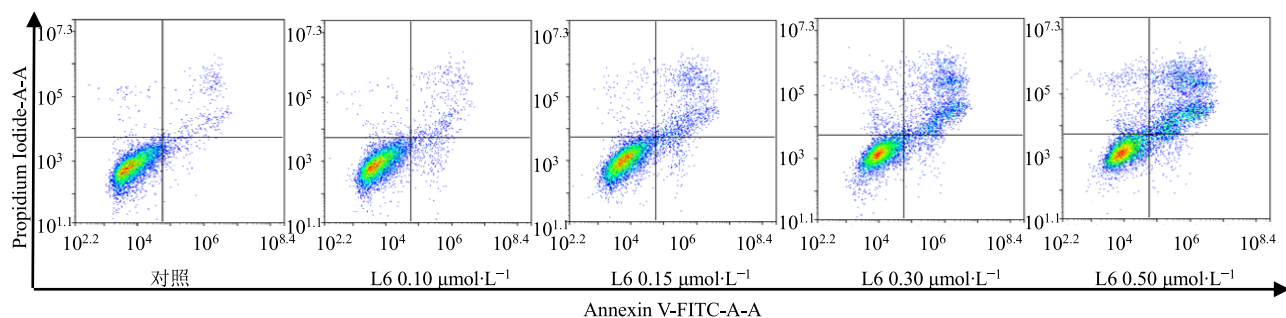
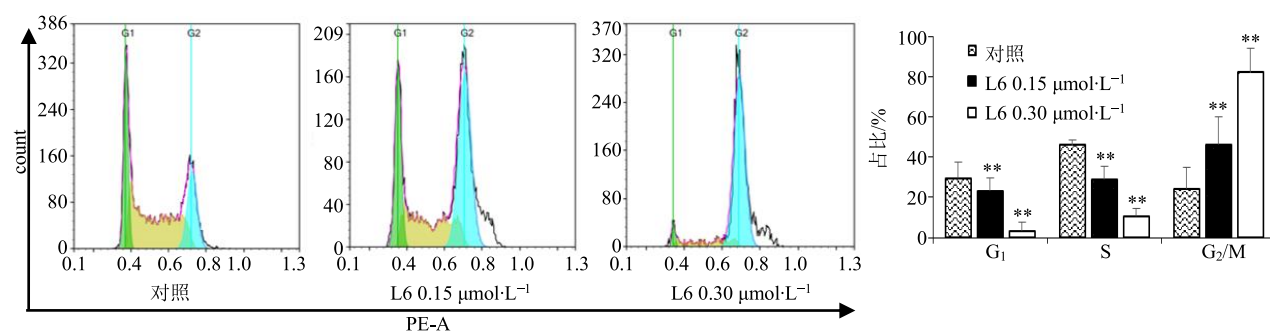
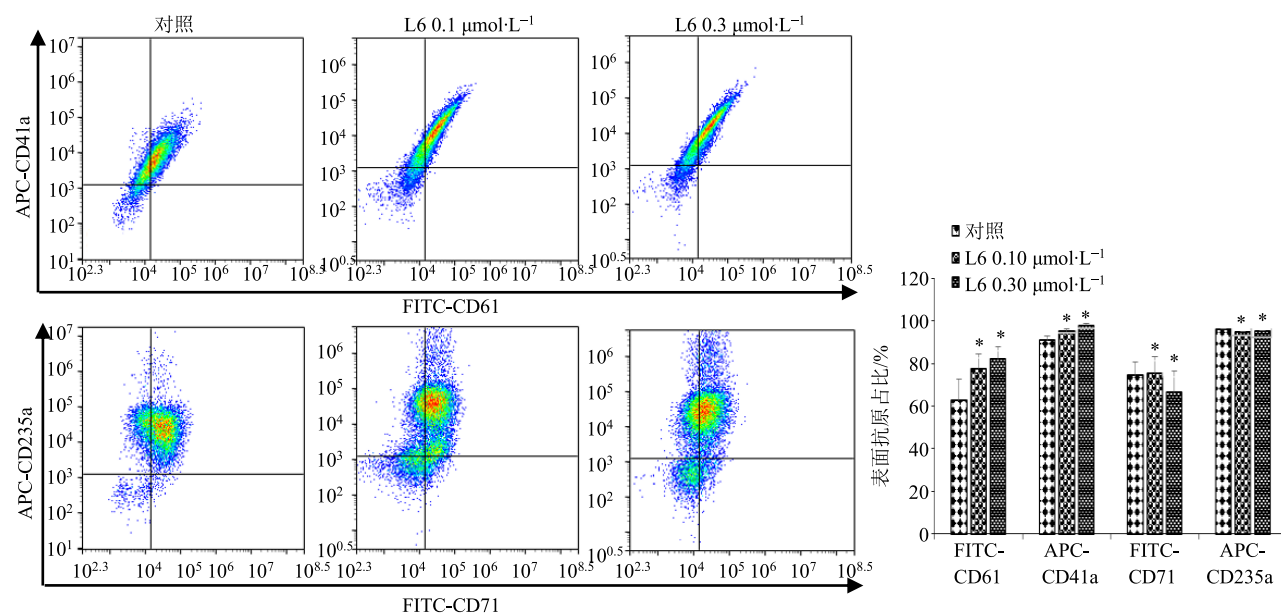
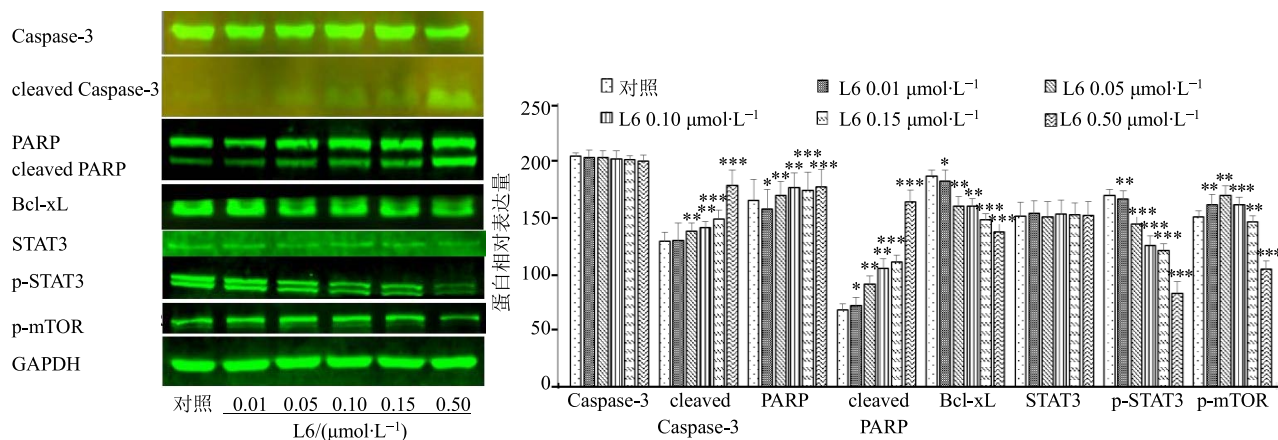


图 2 L6 对 HEL 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effect of L6 on apoptosis of HEL cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 3 L6 对 HEL 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effect of L6 on cell cycle of HEL cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)与对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group图 4 L6 对 HEL 细胞分化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of L6 on differentiation of HEL cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group图 5 L6 对 HEL 细胞蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Effect of L6 on expression of protein in HEL cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

大量 HEL 细胞浸润, 肝组织广泛坏死。与模型组比较, PKC412 和 L6 组小鼠的肝组织内 HEL 细胞浸润有所减轻, 但 L6 组减轻的效果更明显。进一步说明 L6 化合物具有比 PKC412 更好抑制白血病扩散的效果。脏器质量结果 (图 6-B) 表明 PKC412 组和 L6 组小鼠的脾脏质量和肝脏质量明显轻于模型组, 但 L6 效果更显著。

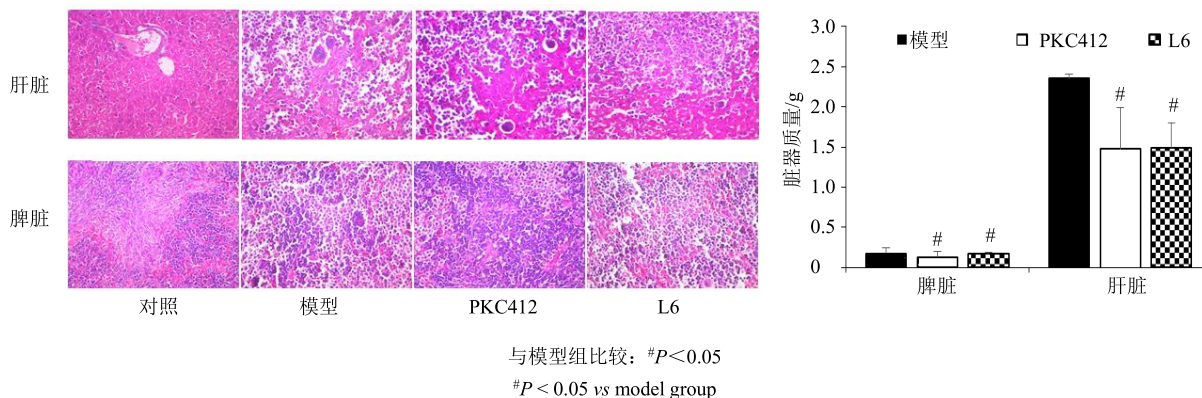
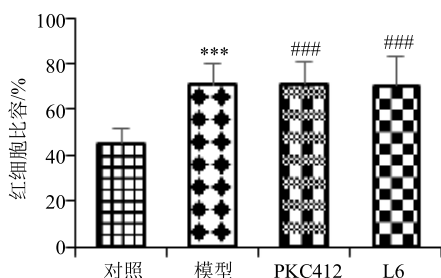


图 6 L6 对白血病模型小鼠脾脏、肝脏的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of L6 on spleen and liver of leukemia model mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group

图 7 L6 对白血病模型小鼠红细胞比容的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of L6 on hematocrit of leukemia model mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

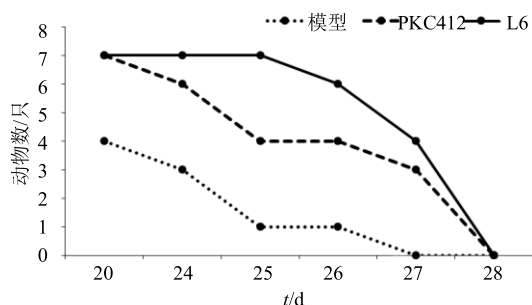


图 8 L6 对白血病模型小鼠生存的影响

Fig. 8 Effect of L6 on survival of leukemia model mice

3.5 L6 对白血病模型小鼠红细胞比容和生存的影响

结果表明, 与对照组比较, 模型组、PKC412 组和 L6 组小鼠红细胞比容显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, PKC412 和 L6 组小鼠的红细胞比容差异不明显 (图 7)。生存曲线结果 (图 8) 表明化合物 L6 和 PKC412 都能一定程度地延长小鼠的寿命。

4 讨论

双吡啶马来酰亚胺衍生物 L6 具有较强的抑制白血病细胞增殖的活性, MTT 结果显示其对白血病细胞的抑制活性明显优于 PKC412。流式细胞术结果表明 L6 从凋亡、周期、分化 3 方面破坏白血病细胞的正常生长增殖。

细胞凋亡被认为是癌症治疗的理想靶点, 是最常见的程序性细胞死亡。在细胞高度复杂的凋亡过程中, 质膜和膜细胞器起着至关重要的作用, 而 Bcl-2 家族和 Caspase 家族则是关键因素。Bcl-xL 是 Bcl-2 蛋白家族中的抗凋亡蛋白, 其表达下调会影响线粒体膜的通透性, 促进细胞色素 C (Cyt C) 的释放, 激活凋亡执行蛋白 Caspase-3, 促进细胞凋亡。STAT3 是许多细胞因子和生长因子受体的一个重要信号转导分子, STAT3 在许多肿瘤细胞中被持续地激活, 并具有致癌潜能和抗凋亡活性。实验结果表明 L6 影响 HEL 细胞中 p-STAT3 的表达水平, 说明其可能靶向 STAT3 而影响细胞的生长。mTOR 激酶是诱导自噬的重要调节分子, L6 处理后的 HEL 细胞 p-mTOR 表达量下降, 说明 L6 也可能诱导白血病细胞发生自噬。

本研究初步阐明了 L6 对白血病细胞具有较好的抑制活性, 并证明了 L6 通过激活细胞内的 Caspase-3 通路引起细胞凋亡, 为白血病的治疗与新药研发提供新方向。

参考文献

- [1] Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, *et al.* The global burden of cancer 2013 [J]. *JAMA Oncol*, 2015, 1(4): 505-527.
- [2] Ward E, DeSantis C, Robbins A, *et al.* Childhood and adolescent cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(2): 83-103.
- [3] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [4] Murphy S L, Xu J, Kochanek K D. Deaths: Final data for 2010 [J]. *Nat Vital Stat Rep*, 2013, 61(4):1-117.
- [5] Howlader N M, Noone A, Krapcho M, *et al.* SEER Cancer statistics review 1975-2004 [R/OL]. National Cancer Institute. 2013. https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2004/.
- [6] Soares M, Saussoy P, Maskens M, *et al.* Eliminating malignant cells from cryopreserved ovarian tissue is possible in leukaemia patients [J]. *Br J Haematol*, 2017, 178(2): 231-239.
- [7] Edwards B K, Noone A M, Mariotto A B, *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975—2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer [J]. *Cancer*, 2014, 120(9): 1290-1314.
- [8] Miller K D, Siegel R L, Lin C C, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(4): 271-289.
- [9] Karaman M W, Herrgard S, Treiber D K, *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(1): 127-132.
- [10] Kawai M, Nakashima A, Kamada S, *et al.* Midostaurin preferentially attenuates proliferation of triple-negative breast cancer cell lines through inhibition of Aurora kinase family [J]. *J Biomed Sci*, 2015, doi: 10.1186/s12929-015-0150-2.
- [11] Fischer T, Stone R M, Deangelo D J, *et al.* Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3 [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(28): 4339-4345.
- [12] Kasamon Y L, Ko C W, Subramaniam S, *et al.* FDA approval summary: Midostaurin for the treatment of advanced systemic mastocytosis [J]. *Oncologist*, 2018, doi: 10.1634/theoncologist.2018-0222.
- [13] 朱伟明, 徐志红, 张亚鹏, 等. 吲哚咔唑和双吲哚马来酰亚胺生物碱及其制备方法和应用: 中国, CN201010167113.2 [P]. 2010-08-25.