

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.26.002
文章编号: 1005-8982 (2018) 26-0007-07

氯沙坦通过 AT1R/VEGF 信号通路对 肝癌血管生成的影响

武荣¹, 张俊涛², 李卫斌³, 王坤⁴, 刘志贞²

(1. 临汾职业技术学院 预防医学教研室, 山西 临汾 041000; 2. 山西医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 山西 太原 030001; 3. 山西大医院 普外科, 山西 太原 030032; 4. 山西省太原市第三人民医院 肝病二科, 山西 太原 030012)

摘要: 目的 探讨氯沙坦是否通过下调血管紧张素 II 1 型受体 (AT1R) / 血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路, 抑制肝癌细胞的血管生成。**方法** 采用免疫荧光染色和 Western blot 检测 AT1R 在肝癌细胞系 HepG2、HuH-7 和 PLC/PRF/5, 以及正常肝细胞 LO2 中的表达。采用 Western blot 检测氯沙坦对肝癌细胞系 HepG2 中 AT1R 表达的影响, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测氯沙坦对肝癌细胞系 HepG2 中 VEGF 的影响。采用免疫组织化学法检测氯沙坦对大鼠肝癌组织中 AT1R、VEGF 和 CD34 表达的影响。**结果** AT1R 在正常肝细胞 LO2 中低表达 ($P < 0.05$), 在肝癌细胞系 HepG2、HuH-7 和 PLC/PRF/5 中高表达 ($P < 0.05$), 在 HepG2 细胞中表达最高 ($P < 0.05$)。在肝癌细胞系 HepG2 中加入氯沙坦后, AT1R 蛋白水平和 VEGF 浓度降低 ($P < 0.05$)。大鼠肝癌组织中 AT1R、VEGF 和 CD34 高表达, 而加入氯沙坦后, AT1R、VEGF 和 CD34 表达降低 ($P < 0.05$)。**结论** 氯沙坦通过抑制 AT1R/VEGF 信号通路, 可以阻碍肝癌血管的生成。

关键词: 氯沙坦; AT1R; VEGF; 血管生成

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

Losartan attenuates angiogenesis in hepatocellular carcinoma via down-regulation of AT1R/VEGF signaling pathway

Rong Wu¹, Jun-tao Zhang², Wei-bin Li³, Kun Wang⁴, Zhi-zhen Liu²

(1. Department of Preventive Medicine, Linfen Vocational and Technical College, Linfen, Shanxi 041000, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 3. Department of General Surgery, Shanxi Dayi Hospital, Taiyuan, Shanxi 030032, China; 4. Second Department of Hepatology, Taiyuan Third People's Hospital, Taiyuan, Shanxi 030012, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Losartan on angiogenesis in hepatocellular carcinoma and angiotensin II receptor 1 (AT1R)/vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. **Methods** Immunofluorescent staining and Western blot were used to detect the expression levels of AT1R in hepatocellular carcinoma cell lines HepG2, HuH-7 and PLC/PRF/5, and normal hepatocytes LO2. In HepG2 cells, Western blot was used to test the variation of AT1R expression level that was influenced by Losartan and then ELISA was used to investigate the change of VEGF level after treatment by Losartan. And immunohistochemistry was used to study the expression levels of AT1R, VEGF and CD34 in hepatocellular carcinoma tissues of rats that were influenced by Losartan. **Results** The results of immunofluorescent staining and Western blot showed the expression level of AT1R was low in LO2 cells ($P < 0.05$), but was high in hepatocellular carcinoma cell lines HepG2, HuH-7 and PLC/

PRF/5 cells ($P < 0.05$), and the highest in HepG2 cells ($P < 0.05$). After addition of Losartan in HepG2 cells, the protein levels of AT1R and VEGF were decreased ($P < 0.05$). The expression levels of AT1R, VEGF and CD34 were high in liver cancer tissues, but decreased after addition of Losartan ($P < 0.05$). **Conclusions** Losartan attenuates angiogenesis in hepatocellular carcinoma via down-regulation of AT1R/VEGF signaling pathway.

Keywords: Losartan; AT1R; VEGF; angiogenesis

全世界范围内肝癌的发病率排第 6 位, 死亡率排第 3 位^[1-2]。微血管密度 (microvessel density, MVD) 被认为是肝癌和其他癌症预后的一个重要指标^[3]。Ang II 1 型受体 (angiotensin II receptor 1, AT1R) 抑制剂氯沙坦具有抗高血压的作用^[4-5]。黑色素瘤^[6]、胰腺癌^[7]、肾癌^[8]和膀胱癌^[9]都表达 AT1R。实验发现, AT1R 拮抗剂可以抑制 AT1R 表达的肿瘤血管生成, 但机制尚不清楚^[10]。本实验检测癌细胞和大鼠肝癌组织中 AT1R 的表达, 研究氯沙坦对血管生成的作用, 从而证明 AT1R 为肝癌肿瘤血管生成的有效靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Ang II、氯沙坦、Hoechst、蛋白提取试剂盒购自美国 Sigma 公司, 胎牛血清、DMEM、MEM 培养基购自美国 Gibco 公司, AT1R 一抗、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 一抗、CD34 一抗购自美国 Abcam 公司, VEGF ELISA kit (美国 Pepro Tech 公司)。

1.2 细胞

肝癌细胞系 HepG2、HuH-7 和 PLC/PRF/5, 以及正常肝细胞 LO2 购自中国科学院上海细胞库。

1.3 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 24 只, 体重 230 ~ 250 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 (合格证: C57B/L-B6D2F1/Crl, 302), 在动物实验中心无菌培养室内饲养。所做处理均符合郑州大学动物伦理中心制定的章程。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 HepG2 和 HuH-7 培养于 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养液中, PLC/PRF/5 和 LO2 培养于 10% 胎牛血清、1% 双抗 MEM 培养液中。将其放置于在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂, 相对湿度 95% 的培养箱中培养。

1.4.2 大鼠肝癌模型的复制 将 24 只大鼠麻醉, 腹腔注射 10% 水合氯醛, 0.1 ml/只。大鼠取仰卧位, 将

其四肢固定于实验板上, 用剪子小心剃去胸腹部毛后擦拭安尔碘消毒, 沿腹白线逐层开腹, 暴露腹腔, 轻压胸腔后, 肝脏暴露出腹腔, 选取最接近体表的肝叶种植肿瘤。用注射针头斜行进针, 刺入肝脏约 1 cm, 轻推注射器针芯, 缓慢注入细胞悬液 20 μl, 约 1 × 10⁶ 个 HepG2 细胞, 缓慢退针, 用无菌棉签轻压片刻后轻送肝脏进入腹腔, 逐层关腹。继续饲养大鼠, 待成瘤模型复制成功后 (皮下结节直径 < 0.5 cm 为成瘤标准), 开始给大鼠 (其中 12 只) 喂药氯沙坦 (5 mg/kg), 持续给药 2 周, 处死大鼠, 取肝癌组织进行实验。

1.4.3 Western blot 检测 将肝癌细胞系 HepG2、HuH-7 和 PLC/PRF/5, 以及正常肝细胞 LO2 培养于 75 mm² 培养瓶中, 待细胞长大约 90% 时, 用细胞刮刀刮下, 冰上裂解提取蛋白。将 HepG2 细胞按 1 × 10⁶ 个 / 孔接种于 6 孔板, 待细胞长到对数生长期时, 分别添加 0、1、10、100 和 1 000 nmol/L Ang II, 100 nmol/L Ang II + 0.1 μmol/L 氯沙坦, 100 nmol/L Ang II + 1.0 μmol/L 氯沙坦, 1 000 nmol/L Ang II + 10.0 μmol/L 氯沙坦, 培养 24 h。用细胞刮刀刮下细胞, 冰上裂解提取蛋白, 用二喹啉甲酸法测定每组蛋白质浓度, 总蛋白上样量为 35 μg / 孔, 上完样后进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转膜 (80 V, 90 min), 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜 5 min/次, 共 5 次。分别用一抗 AT1R (1 : 500)、GAPDH (1 : 1 000) 4℃ 过夜, TBST 洗膜 5 min/次, 共 5 次。用稀释比例为 1 : 1 000 的羊抗兔二抗 37℃ 摇床反应 1 h, TBST 洗膜 5 min/次, 共 5 次。采用 ECL 试剂盒进行显色, 凝胶成像分析系统拍照后, 用 Lab Works 4.6 软件进行灰度值分析。

1.4.4 酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 将 HepG2 细胞按 1 × 10⁶ 个 / 孔接种于 6 孔板, 细胞贴壁 12 h 后, 用无血清的 DMEM 培养 12 h, 添加 100 nmol/L Ang II、100 nmol/L Ang II + 0.1 μmol/L 氯沙坦、100 nmol/L Ang II + 1.0 μmol/L 氯沙坦、1 000 nmol/L Ang II + 10.0 μmol/L 氯沙坦, 培养 24 h。吸取培养液于离心管中, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液。VEGF 的检测按照 VEGF ELISA kit 试剂盒说明书进行操作。

1.4.5 免疫组织化学法 取大鼠肝癌组织制成切片, 将切片固定于载玻片上干燥处理。将石蜡切片放入二甲苯 I、II 中进行脱蜡, 然后逐级放置于 100% 纯酒精 I、II, 95%、80% 和 70% 酒精, 以及水中各 5 min, 进行水化。水化后的切片放于 3% 双氧水 H_2O_2 中室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次。将切片放入柠檬酸缓冲液 (0.01 nmol/L, pH 6.0) 中, 加热至沸腾改中火 ($>92^\circ C$), 室温下复温, PBS 洗涤 3 次。吸干多余液体, 滴加山羊血清封闭液, $37^\circ C$ 孵育 30 min。分别滴加 AT1R (1 : 300)、VEGF (1 : 800) 和 CD34 (1 : 600) 一抗 $4^\circ C$ 过夜, 取出后在 $37^\circ C$ 烤箱中复温 30 min, PBST 洗 3 次。滴加生物素抗兔二抗, $37^\circ C$ 孵育 1 min, PBST 洗涤 3 次。用 DAB 试剂盒显色 10 min, 显色终止后清洗切片。滴加苏木精室温染液 3 min, 清水洗掉苏木精染液, 盐酸酒精分化 1 s, 氨水返蓝 5 min。将切片分别放入 70% 和 80% 酒精各 1 min, 90% 酒精 2 min, 95% 酒精 3 min, 100% 酒精 I、II 各 3 min。二甲苯 I、II 各 15 min, 取出晾干后用中性树胶封片。每个标本以只滴加 PBS 液作为阴性对照, 在显微镜下观察各切片着色情况。

1.4.6 免疫荧光染色 将盖玻片放到 6 孔板中, 肝癌

细胞系 HepG2、HuH-7 和 PLC/PRF/5, 以及正常肝细胞 LO2 均按 1×10^5 个 /ml 接种于 6 孔板中, 待细胞长至 80% 时, 弃上清, PBS 洗 3 次, 10 min/次。4% 多聚甲醛室温固定细胞 20 min, PBS 洗 3 次, 添加 0.1% Triton X-100 细胞打孔, 1% 胎牛血清白蛋白封闭, 加入 AT1R (1 : 500) 抗体 $4^\circ C$ 过夜, PBS 洗 3 次, 加入 FITC 标记的羊抗鼠二抗和 Hoechst, 室温孵育 1 h, 将盖玻片放到载玻片上, 荧光显微镜下观察拍照。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或方差分析, 两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AT1R 在各细胞系中的表达

荧光显微镜下观察 AT1R 在肝癌细胞系 HepG2、HuH-7 和 PLC/PRF/5, 以及正常肝细胞 LO2 中的表达, 发现 AT1R 在正常肝细胞 LO2 中绿色荧光强度低, 而在肝癌细胞系 HepG2、HuH-7 和 PLC/PRF/5 中绿色荧光强度高, 在 HepG2 细胞中绿色荧光最强, 即 AT1R 在 HepG2 细胞中表达最高。见图 1。

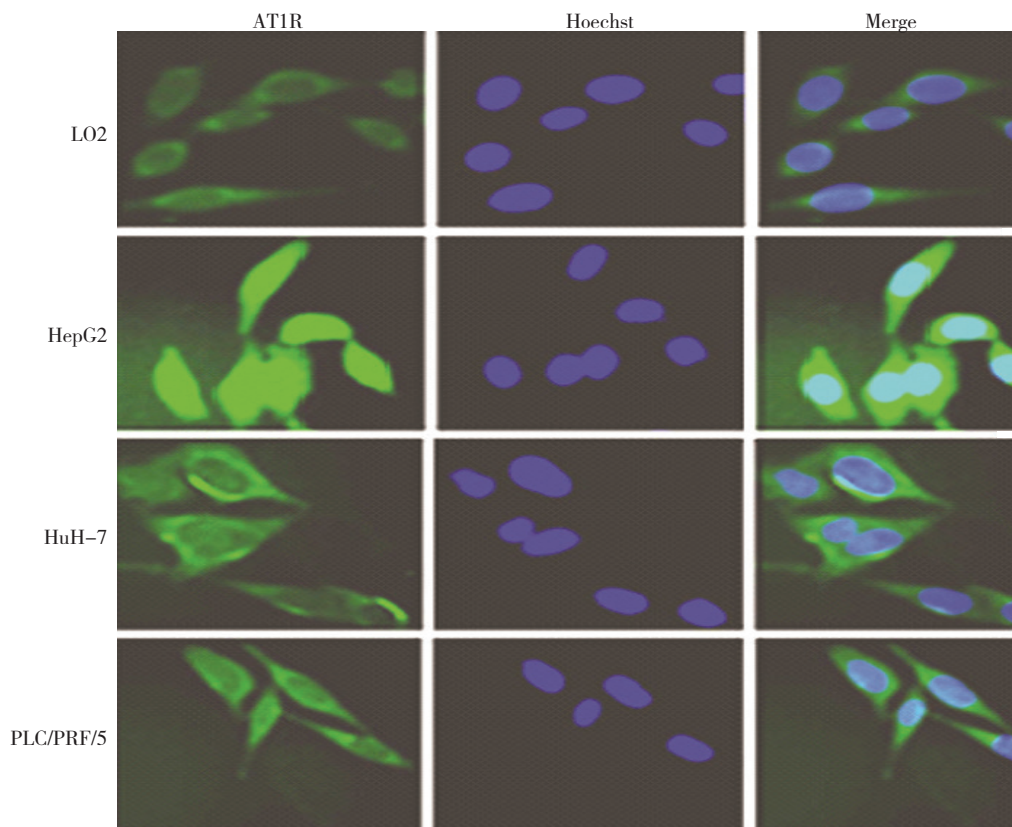
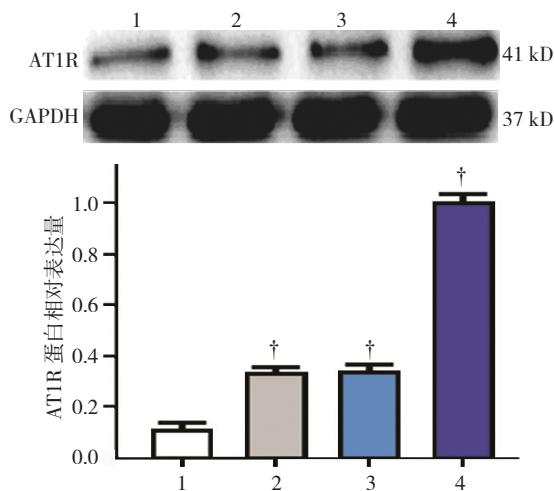


图 1 AT1R 在各细胞系中的表达 (荧光显微镜 $\times 100$)

2.2 AT1R 蛋白在各细胞系中的表达

为进一步证明荧光显微镜的观察结果, 采用 Western blot 检测 AT1R 在肝癌细胞系 HepG2、HuH-7 和 PLC/PRF/5, 以及正常肝细胞 LO2 中的表达, 其相对表达量分别为 (1.00 ± 0.03) 、 (0.37 ± 0.02) 、 (0.36 ± 0.02) 、 (0.11 ± 0.02) , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=829.274, P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, AT1R 在正常肝细胞 LO2 中低表达, 在肝癌细胞系 HepG2 中高表达 ($t=1.874, P=0.008$), 在 HuH-7 和 PLC/PRF/5 中高表达 ($t=1.272$ 和 $1.568, P=0.032$ 和 0.019)。见图 2。



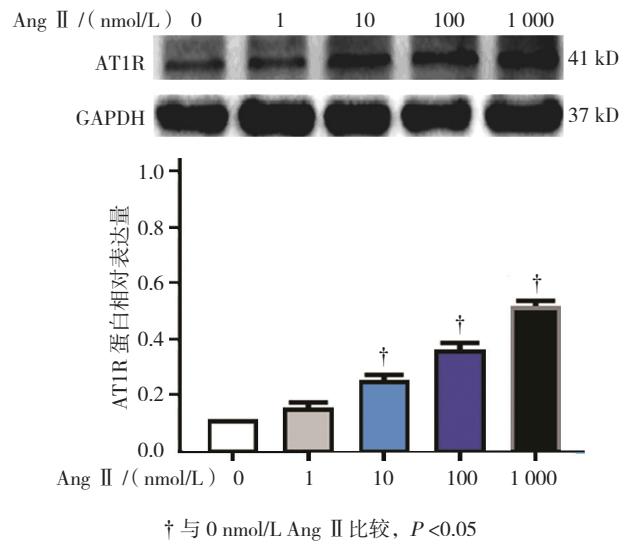
1: 正常肝细胞 LO2; 2: HuH-7; 3: PLC/PRF/5; 4: HepG2。
† 与正常肝细胞 LO2 比较, $P < 0.05$

图 2 AT1R 蛋白在各细胞系中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 氯沙坦对肝癌细胞系 HepG2 中 AT1R 蛋白表达的影响

上述实验表明 AT1R 在肝癌细胞系 HepG2 中表达最高, 故进一步用 Western blot 检测氯沙坦对肝癌细胞系 HepG2 中 AT1R 表达的影响。0、1、10、100 和 1 000 nmol/L Ang II 浓度组的 AT1R 蛋白相对表达量分别为 (0.10 ± 0.01) 、 (0.14 ± 0.02) 、 (0.25 ± 0.03) 、 (0.36 ± 0.03) 、 (0.51 ± 0.03) , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=131.774, P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 0 nmol/L 与 1 nmol/L Ang II 比较, 差异无统计学意义 ($t=0.325, P=0.078$); 与 0 nmol/L Ang II 相比, 从 10 nmol/L Ang II 开始, 随着 Ang II 浓度增加, AT1R 蛋白表达量逐渐升高 ($t=1.643, 3.428$ 和 $2.953, P=0.014, 0.000$ 和 0.000)。见图 3。

0 nmol/L Ang II + 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 氯沙坦、100 nmol/L Ang II + 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 氯沙坦、100 nmol/L Ang II + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 氯沙坦、100 nmol/L Ang II + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 氯

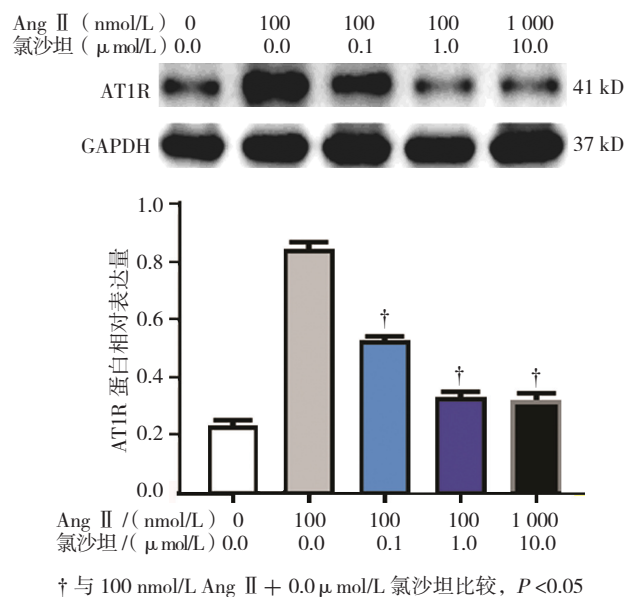


† 与 0 nmol/L Ang II 比较, $P < 0.05$
图 3 不同浓度 Ang II 对肝癌细胞系 HepG2 中 AT1R 蛋白的表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

沙坦、1 000 nmol/L Ang II + 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 氯沙坦组的 AT1R 相对表达量分别为 (0.21 ± 0.02) 、 (0.84 ± 0.03) 、 (0.52 ± 0.02) 、 (0.31 ± 0.03) 、 (0.29 ± 0.03) , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=281.878, P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 与 100 nmol/L Ang II + 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 氯沙坦组相比, 随着氯沙坦浓度增加, AT1R 蛋白表达水平逐渐降低 ($t=2.953, 4.058$ 和 3.194 , 均 $P=0.000$)。见图 4。

2.4 氯沙坦对肝癌细胞系 HepG2 中 VEGF 的影响

0 nmol/L Ang II + 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 氯沙坦、100 nmol/L



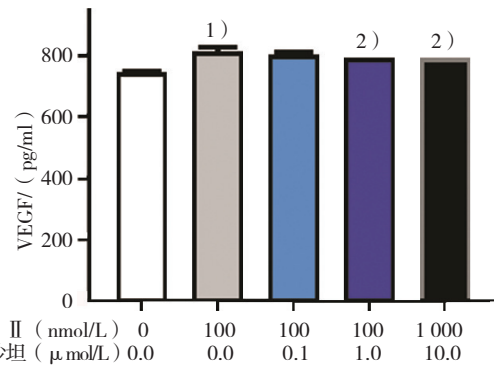
† 与 100 nmol/L Ang II + 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 氯沙坦比较, $P < 0.05$
图 4 不同浓度 Ang II + 氯沙坦对肝癌细胞系 HepG2 中 AT1R 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Ang II + 0.0 μmol/L 氯沙坦、100 nmol/L Ang II + 0.1 μmol/L 氯沙坦、100 nmol/L Ang II + 1.0 μmol/L 氯沙坦、1 000 nmol/L Ang II + 10.0 μmol/L 氯沙坦组的 VEGF 表达量分别为 (730.1 ± 10.0)、(806.6 ± 18.1)、(789.0 ± 12.0)、(780.8 ± 1.0)、(769.7 ± 1.0), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=21.322, P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 100 nmol/L Ang II + 0.0 μmol/L 氯沙坦组较 0 nmol/L Ang II + 0.0 μmol/L 氯沙坦组的 VEGF 表达量增加 ($t=1.215, P=0.041$); 与 100 nmol/L Ang II + 0.0 μmol/L 氯沙坦组比较, 当氯沙坦的浓度为 1.0 μmol/L 时, VEGF 的表达量降低 ($t=1.383, P=0.030$); 当氯沙坦的浓度为 10.0 μmol/L 时, VEGF 的表达量进一步降低 ($t=1.407, P=0.028$)。见图 5。

2.5 氯沙坦对大鼠肝癌组织中 AT1R、VEGF 及 CD34 表达的影响

免疫组织化学法检测结果显示, 氯沙坦对 AT1R、VEGF 及 CD34 的表达有较明显的影响 (见图 6)。对照组和氯沙坦组的 AT1R 阳性表达率分别为 (62.07 ± 3.86)% 和 (43.57 ± 4.21)%, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=$

1.920, $P=0.034$), 氯沙坦组较低 (见图 7)。对照组和氯沙坦组的 VEGF 阳性表达率分别为 (57.38 ± 6.16)% 和 (19.87 ± 3.29)%, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=2.963, P=0.000$), 氯沙坦组较低 (见图 8)。对照组和氯沙坦组的 AT1R 阳性表达率分别为 (56.83 ± 5.17)% 和 (17.56 ± 3.12)%, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=3.536, P=0.000$), 氯沙坦组较低 (见图 9)。



1) 与 0 nmol/L Ang II + 0.0 μmol/L 氯沙坦比较, $P < 0.05$;
2) 与 100 nmol/L Ang II + 0.0 μmol/L 氯沙坦比较, $P < 0.05$

图 5 氯沙坦对肝癌细胞系 HepG2 中 VEGF 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

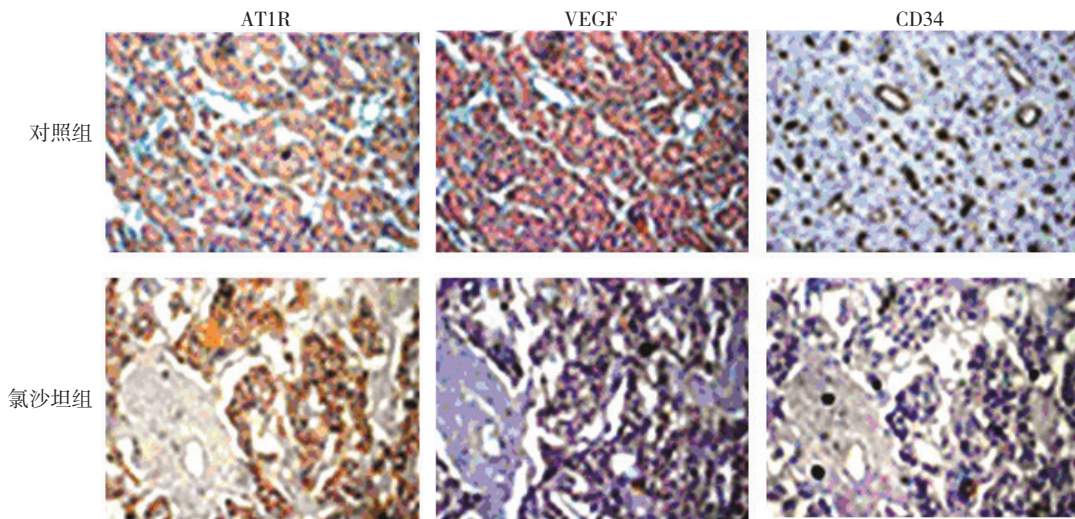
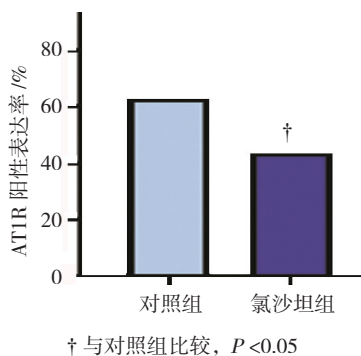
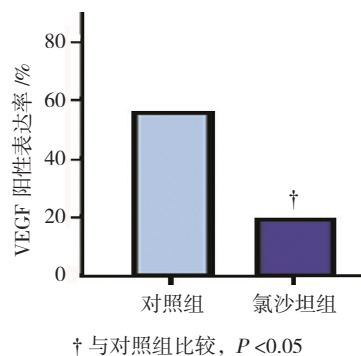


图 6 大鼠肝癌组织中 AT1R、VEGF 及 CD34 的阳性表达 (免疫组织化学法 × 800)



† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 7 氯沙坦对大鼠肝癌组织中 AT1R 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)



† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 8 氯沙坦对大鼠肝癌组织中 VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

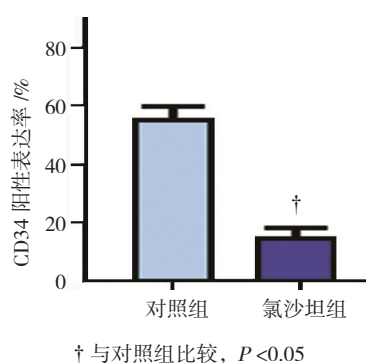


图 9 氯沙坦对大鼠肝癌组织中 CD34 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

AT1R 在乳腺癌、胰腺癌、膀胱癌、肾癌等各种恶性肿瘤中表达^[11]。有报道表明, AT1R 参与多种动物模型中肿瘤的发生、发展^[12]。但是在人肝癌细胞中, AT1R 的表达报道甚少。FAN 等^[13]证明, AT1R 在肝癌细胞系中高表达, 其与肝癌的血管生成相关。本研究通过体内外实验证明 AT1R 阻断剂氯沙坦对肝癌血管生成的影响。免疫组织化学法结果表明, 肝癌细胞中均有 AT1R 的表达, 同时 VEGF 在肝癌细胞中的表达趋势与 AT1R 一致。VEGF 是由肿瘤细胞分泌的、重要的血管生成刺激因子, 同时 VEGF 的表达与肝癌预后有关。通过上调 VEGF 可以刺激血管的生成, Ang II 通过与 G 蛋白偶联受体 AT1R 结合, 介导很多细胞效应。因此, Ang II-AT1R-VEGF 系统在控制肝癌细胞血管生成中有重要作用。

除了 VEGF, 肿瘤内的 MVD 也是评估恶性肿瘤患者预后的重要定量参数。CD31、CD34、vWF 为鉴定 MVD 的上皮细胞特异性标志^[14]。MVD 与 AT1R 的表达呈正相关, 约 70% 高 MVD 样本中, AT1R 有高表达现象。MVD 可以有效反映肿瘤血管的生成。并且 MVD 的增加与 VEGF 表达呈正相关^[15]。笔者推测, AT1R 对肝癌血管的生成具有重要作用, 所以 AT1R 对调节 VEGF-A 具有重要作用。血管生成已成为药物治疗的一个重要的靶点, 许多血管生成抑制药物已经用于临床。在本研究中, Ang II 通过上调 AT1R 蛋白表达来促进肝癌细胞中 VEGF 的产生, 同时氯沙坦可以抑制该现象。本研究同时证明, 氯沙坦可以有效抑制肿瘤的生长和 VEGF 的表达。作为 AT1R 的抑制剂, 氯沙坦可以抑制体内固体瘤的生长, 这种抑制可能是通过抑制血管生成介导的。

AT1R 参与癌细胞增殖。但是 SUGANUMA 等^[16]实验表明, Ang II 不能有效地促进卵巢癌细胞的增殖。同时在本实验中, Ang II 可以增加 VEGF 的分泌, AT1R 也许没有直接参与肝癌细胞的增殖, 并且血管紧张素 II-AT1R 体系在不同类型肿瘤细胞的发展过程中也起到不同的作用。

综上所述, 本研究结果表明, AT1R 表达于肝癌细胞中, 并与肿瘤血管生成有关。AT1R 的抑制剂可以抑制实验动物模型中肿瘤血管的生成。尽管如此, AT1R 阻抑剂氯沙坦的实验结果表明, 氯沙坦既无直接的毒性作用, 也无抗增殖的作用。根据体内外实验结果, 笔者将氯沙坦的抗肿瘤作用归结于抗血管的生成作用, 而不是直接的毒性作用。AT1R 不仅是一个很有潜力的预后指示因子, 而且是肝癌治疗的一个重要靶点。

参考文献:

- [1] GAO C. Molecular pathological epidemiology in diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma[J]. World J Hepatol, 2016, 8(27): 1119-1127.
- [2] 张金梁, 翟博, 方泰石, 等. 晚期肝癌和复发性肝癌治疗的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(2): 358-361.
- [3] LIU X, ZHANG A, XIANG J, et al. miR-451 acts as a suppressor of angiogenesis in hepatocellular carcinoma by targeting the IL-6R-STAT3 pathway[J]. Oncol Rep, 2016, 36(3): 1385-1392.
- [4] MENG Y C, DING Z Y, WANG H Q, et al. Effect of microRNA-155 on angiogenesis after cerebral infarction of rats through AT1R/VEGFR2 pathway[J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(10): 829-835.
- [5] 曲环, 李美红, 陈琛, 等. 氯沙坦对自发性高血压大鼠心脏保护作用与肝细胞生长因子的关系 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2013, 23(4): 208-211.
- [6] FERRARI de ANDRADE L, MOZELESKI B, LECK A R, et al. Inhalation therapy with M1 inhibits experimental melanoma development and metastases in mice[J]. Homeopathy, 2016, 105(1): 109-118.
- [7] LAU S T, LEUNG P S. Role of the RAS in pancreatic cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2011, 11(4): 412-420.
- [8] 郭刚, 施国海, 张帆, 等. 血管紧张素系统抑制剂与舒尼替尼治疗晚期肾癌患者疗效的相关性研究 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2015, 30(4): 294-298.
- [9] 万沛. 血管紧张素 2 型受体诱导膀胱癌细胞 (EJ) 凋亡的实验研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [10] OKWAN-DUODU D, LANDRY J, SHEN X Z, et al. Angiotensin-converting enzyme and the tumor microenvironment: mechanisms

- beyond angiogenesis[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 305(3): R205-R215.
- [11] DOLLEY-HITZE T, VERHOEST G, JOUAN F, et al. Angiotensin-2 type 1 receptors(AT1R)and cancers[J]. *Nephrol Ther*, 2013, 9(2): 85-91.
- [12] CHEN X, MENG Q, ZHAO Y, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonists inhibit cell proliferation and angiogenesis in breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(2): 318-324.
- [13] FAN F, TIAN C, TAO L, et al. Candesartan attenuates angiogenesis in hepatocellular carcinoma via downregulating AT1R/VEGF pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 704-711.
- [14] MARIEN K M, CROONS V, WAUMANS Y, et al. Development and validation of a histological method to measure microvessel density in whole-slide images of cancer tissue[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): DOI: org/10.1371/journal.pone.0161496.
- [15] SHIROTAKE S, MIYAJIMA A, KOSAKA T, et al. Angiotensin II type 1 receptor expression and microvessel density in human bladder cancer[J]. *Urology*, 2011, 77(4): e19-e25.
- [16] SUGANUMA T, INO K, SHIBATA K, et al. Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion,angiogenesis, and peritoneal dissemination[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(7): 2686-2694.

(童颖丹 编辑)

欢迎订阅《中国现代医学杂志》

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年,系中国科技论文统计源期刊、北大中文核心期刊、中国核心学术期刊(RCCSE)(A-)及湖南省十佳期刊,被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个检索系统收录。本刊是中华人民共和国教育部主管的综合性医学学术期刊,以服务于广大医药卫生科技人员,促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学湘雅医院主办,湖南省湘雅医学学术期刊社有限公司出版。

《中国现代医学杂志》辟有基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。主要刊登国内外临床医学、基础医学、预防医学以及医学相关学科的新理论、新技术、新成果,以及医院医疗、教学、科研、管理最新信息、动态等内容。读者为广大医药卫生工作者。

《中国现代医学杂志》为旬刊,国际标准开本(A4),全刊为彩色印刷,无线胶装。内芯采用 90 g 芬欧汇川雅光纸(880×1 230 mm),封面采用 200 g 紫鑫特规双面铜版纸(635×965 mm)印刷,每个月 10、20、30 日出版。定价 25 元/册,全年 900 元。公开发行,国内统一刊号:CN 43-1225/R;国际标准刊号:ISSN 1005-8982;国内邮发代号:42-143。欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅,漏订或需增订者也可直接与本刊发行部联系订阅。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国现代医学杂志》发行部,邮编:410008

电话:0731-84327938;传真:0731-89753837;E-mail:journal@zgxdyx.com

唯一官网网址:www.zgxdyx.com