

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.09.016

AGTR1 过表达对肝细胞癌细胞株 BEL - 7404 生长的影响*

蒋会荣^{1,2}, 黄 皓^{1,2}, 李晓龙^{1,3}, 张馨月^{2,3}, 台宗光³, 朱全刚^{1,3}, 鲍蕾蕾^{1,2,4Δ}

(1. 蚌埠医学院药学院, 安徽 蚌埠 233030; 2. 中国人民解放军海军军医大学第三附属医院, 上海 200438; 3. 上海市皮肤病医院, 上海 200443; 4. 中国人民解放军海军军医大学第一附属医院, 上海 200433)

摘要:目的 为肝细胞癌(HCC)的靶向药物治疗提供新思路。方法 检索 TCGA 数据库中的 HCC RNA 芯片数据集, 比较数据集中 AGTR1 与血管内皮生长因子 A(VEGFA)的表达是否具有相关性; 通过体内实验研究 AGTR1 过表达对 HCC 细胞生长的影响。结果 AGTR1 与 VEGFA 的表达具有相关性, 且随着 AGTR1 表达的上升相关性增强。通过对 HCC 细胞株 BEL - 7404 的体内实验发现, AGTR1 的过表达能引起 VEGFA 的表达上调, 进而促进 HCC 细胞的生长; 洛沙坦对过表达 AGTR1 的 BEL - 7404 细胞具有一定抑制作用, 可抑制 VEGFA 蛋白的表达。结论 AGTR1 抑制剂对 AGTR1 过表达引起的 VEGFA 上调具有抑制作用, 为进一步研究 AGTR1 抑制剂应用于 AGTR1 高表达 HCC 患者的靶向治疗提供了参考。

关键词:肝细胞癌; AGTR1; 血管内皮生长因子 A; 血管生成; 洛沙坦

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 4931(2022)09 - 0068 - 07

Effect of AGTR1 Overexpression on the Growth of Hepatocellular Carcinoma Cell Line BEL - 7404

JIANG Huirong^{1,2}, HUANG Hao^{1,2}, LI Xiaolong^{1,3}, ZHANG Xinyue^{2,3}, TAI Zongguang³, ZHU Quanguang^{1,3}, BAO Leilei^{1,2,4}

(1. School of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, China 233030; 2. The Third Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai, China 200438; 3. Shanghai Skin Disease Hospital, Shanghai, China 200443; 4. The First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai, China 200433)

Abstract: Objective To provide new ideas for targeted drug therapy of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The RNA

* 基金项目: 上海市自然科学基金[19ZR1456500]。

第一作者: 蒋会荣, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为抗肿瘤药理学, (电子信箱)1346218500@qq.com。

Δ通信作者: 鲍蕾蕾, 女, 博士研究生, 副主任药师, 研究方向为抗肿瘤药理学, (电话)021-81875571(电子信箱)annabao212@126.com。

- 健国际交流促进会高血压分会, 中国妇幼保健协会围产营养与代谢委员会, 等. 中国临床合理补充叶酸多学科专家共识[J]. 医药导报, 2021, 40(1): 1 - 19.
- [2] 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南工作组, 任爱国, 张雪娟, 等. 围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南(2017)[J]. 中国生育健康杂志, 2017, 28(5): 401 - 410.
- [3] 王晓慧, 姜文洁, 张东峰, 等. PAI - 1 基因 4G / 5G 多态性与中国地区原因不明习惯性流产的 Meta 分析[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(16): 3029 - 3031.
- [4] 韩 姘, 牛秀敏, 张慧英. 妊娠期糖尿病 PAI - 1 4G / 5G 基因多态性与胰岛素抵抗的相关性[J]. 现代妇产科进展, 2008, 17(12): 913 - 915.
- [5] 潘 琳, 李 霞, 蔡永梅, 等. PAI - 1 和 ACE 基因多态性与反复自然流产的关联性[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(8): 624 - 627.
- [6] 邢焕霞, 付 敏, 郑胜侠, 等. 廊坊地区 MTHFR C677T 基因多态性和孕早期不同阶段血清 HCY 水平的相关性研究[J]. 河北医药, 2020, 42(15): 2370 - 2373.
- [7] 覃意往, 莫梅香, 张龙炯, 等. 贵州省荔波县汉族和布依族女性 MTHFR 与 MTRR 多态性的分布[J]. 基础医学与临床, 2021, 41(5): 694 - 697.
- [8] 朱慧萍, 刘明珠, 刀京晶, 等. mthfr 基因第 1298 位核苷酸多态性与酶活性的关系[J]. 北京医科大学学报, 2000, 32(3):

262 - 264.

- [9] SHARIF ME, MOHAMEDAIN A, AHMED AA, et al. Folic acid level and preterm birth among Sudanese women [J]. Maternal Health Neonatology and Perinatology, 2017, 3: 25.
- [10] 朱娟娟, 唐吉斌. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分析的临床应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(6): 361 - 366.
- [11] 林新城, 强桂彦. 中国育龄期女性 MTHFR、MTRR 基因型与出生缺陷对沧州地区叶酸增补的借鉴分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2019, 30(6): 80 - 84.
- [12] PAN YC, ZHANG WB, MA JQ, et al. Infants' MTHFR polymorphisms and nonsyndromic orofacial clefts susceptibility: A meta-analysis based on 17 case - control studies [J]. Am J Med Genet A, 2012, 158A(9): 2162 - 2169.
- [13] 李静波, 罗钰铭, 郭 玲, 等. 基于 MTHFR 基因多态性分析不同时期叶酸摄入与子痫前期及其亚型的相关性[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(13): 2463 - 2467.
- [14] 罗世强, 邱 萍, 严提珍, 等. 广西柳州地区苗族女性 MTRR 和 MTHFR 基因多态性分布研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(9): 20 - 23.
- [15] 李光梅, 洗志霞, 邓舒静. PAI - 1 的水平与不明原因反复自然流产的关系[J]. 海南医学, 2016, 27(11): 1856 - 1857.

(收稿日期: 2021 - 07 - 26; 修回日期: 2021 - 11 - 22)

microarray dataset of HCC patients in the TCGA database was searched to compare whether the expression of AGTR1 and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in the dataset was correlated. The effect of AGTR1 overexpression on the growth of HCC cells was studied by *in vivo* and *in vitro* experiments. **Results** The expression of AGTR1 and VEGFA was correlated, and the correlation was increased with the increase of AGTR1 expression. The *in vitro* and *in vivo* experiments on the HCC cell line BEL-7404, showed that AGTR1 overexpression could increase the expression of VEGFA and promote the growth of HCC cells. Losartan had a certain inhibitory effect on BEL-7404 cells overexpressing AGTR1, and could inhibit VEGFA protein expression. **Conclusion** AGTR1 inhibitor has a inhibitory effect on the up-regulation of VEGFA caused by AGTR1 overexpression, which provides a reference for the further study of AGTR1 inhibitor in the targeted therapy of HCC patients with high AGTR1 expression. **Key words:** hepatocellular carcinoma; AGTR1; vascular endothelial growth factor A; angiogenesis; losartan

肝细胞癌(HCC)是原发性肝癌最常见的类型,由于其血管明显异常,如动脉化和毛细血管化,导致血流异常、渗漏过多等^[1-2],认为是典型的血管生成性肿瘤^[3]。LEVER等^[4]的一项针对患者服用血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)的回顾性研究发现,服用该类药物治疗患者患癌症的风险更低,也证明了血管紧张素受体抑制剂(ARB)可降低患癌风险^[5]。另外,发现肾素血管紧张素(Ang)系统中一个编码血管紧张素Ⅱ1型受体(AT1R)的基因AGTR1在多种肿瘤中有异质性表达,且该基因的过表达会引起多种肿瘤(如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胃癌等)的不良预后^[6-9],但HCC中AGTR1的表达情况及其对HCC的影响尚不清楚。越来越多的研究表明,瞄准AngⅡ/AT1R轴可通过减少血管内皮生长因子A(VEGFA)的表达来抑制血管生成和减少血管渗透,从而抑制肿瘤细胞生长和转移^[10-12]。AGTR1可能通过增加VEGFA的表达来促进肿瘤细胞的生长,同时抑制剂洛沙坦可通过抑制肿瘤血管的生成来影响肿瘤的生长。本研究中通过基因转染技术构建了过表达AGTR1的肝癌细胞,通过体内外实验研究AGTR1对肿瘤生长的影响,以及AGTR1与VEGFA表达的关系,同时考察AGTR1抑制剂洛沙坦在体内对血管生成的作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂、细胞株与动物

仪器:ABI 7300型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司);Tannon 1600型全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能公司);Thermo 240型CO₂培养箱(美国Thermo公司);Olympus ck×53型倒置显微镜(日本Olympus公司)。

试剂:RPMI 1640培养基(美国Hyclone公司,批号为SH30809.01B);胎牛血清(法国Biowest公司,批号为S1400);0.25%Trypsin-EDTA(美国Gibco公司,批号为15400054);BCA蛋白浓度测定试剂盒(日本Beyotime公司,批号为P0010);SYBR Premix EX Taq(日本TaKaRa公司,批号为639676);引物(上海生工生物工程有限公

司,批号为B661104);M-PER(批号为78501),T-PER(批号为78510),均购于美国Thermo公司;AGTR1特异性一抗(美国Santa Cruz公司,批号为sc-29750);三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH, Cell Signaling Technology公司,批号为97166);Plasmid Maxi Kit(E. Z. N. A公司,批号为D2485);Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(日本Dojindo公司,批号为CK04);Transwell小室(美国Corning公司,批号为Scipu001412);Puromycin(德国Sigma公司,批号为AB3258);Isoflurane(深圳瑞沃德公司,批号为R510-22);洛沙坦(MedChem Express,规格为1g,批号为20170307)。

细胞株:BEL-7404肝癌细胞株购自ATCC细胞库。

动物:6周龄雄性BALB/c裸鼠(上海毕凯实验动物公司,动物生产许可证号为SCXK<沪>2013-0016),于26℃条件下,置动物隔离器中饲养。

1.2 方法

TCGA数据库中获取数据:通过网址<https://cancergenome.nih.gov/>登陆TCGA数据库,检索HCC RNA芯片数据集,下载2018年1月5日至3月5日TCGA-2V-A95S~TCGA-G3-A25S(374肝癌RNA-Seq)和TCGA-BC-A10Q~TCGA-G3-A3CH(50例癌旁样本)的RNA-Seq及临床数据,检索AGTR1和VEGFA基因,并整理其表达值,同时进行相关性分析。

细胞培养与转染:BEL-7404细胞置RPMI 1640培养基(含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素),并置含5%CO₂的37℃培养箱中培养。取对数生长期的BEL-7404细胞,均匀接种至6孔板中培养(3×10⁵个细胞/孔),待细胞生长至30%~50%时,将2μg质粒DNA加入100μL Opti-MEM稀释,将4μL jetPEITM加入100μL Opti-MEM稀释,将稀释后的jetPEITM加入质粒稀释液中,轻轻混匀,室温孵育20~30min。然后将200μL混合液滴加至换有新鲜培养液的6孔板中,轻轻混匀,置培养箱中培养。

实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测基因表达:组织中RNA采用TRIzol(Invitrogen)法提取,

用Fast200试剂盒提取细胞中mRNA。逆转录酶试剂盒的反应条件为42℃、20 min和85℃、5 min。SYBR Green试剂盒用于qRT-PCR,反应条件为预变性95℃、30 s,40个循环(95℃、5 s,57℃、45 s,72℃、45 s),72℃、60 s。GAPDH作为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对定量。引物序列为AGTR1 (Sense ATCCCAGAAAGTCGGCACCAGATG, Anti-sense TGACTTTGGCTACAAGCATTGTGCG); GAPDH (Sense GAGCGAGATCCCTCCAAAAT, Anti-sense RGGCTGTTGTCATACTTCTCATGG)。

蛋白免疫印迹法检测细胞表达:收集细胞,离心(转速为3 500 r/min)5 min,向细胞中加入300 μ L M-PER后4℃冰浴30 min(期间每10 min振荡1次),离心(转速为12 000 r/min)15 min,收集蛋白质。采用BCA法测定蛋白质浓度,定量后上样,混匀,100℃加热5 min,冷却后上样10 μ L(50 μ g蛋白/泳道)。将胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上,并在室温条件下用TBST封闭2 h,加入相应浓度的一抗,4℃孵育过夜;次日用TBST洗脱3次,每次15 min;加入二抗孵育1 h。加入显影检测试剂与膜蛋白充分混匀,室温孵育5 min,用凝胶成像仪曝光并拍照。

CCK-8法检测细胞增殖:收集细胞,以每孔100 μ L(2×10^3 个细胞/孔)置96孔板,每组重复6个。将转染细胞分别培养指定时间后加入CCK-8试剂,置37℃孵育2 h,测量450 nm波长处的吸光度(OD)值。

克隆形成实验:将收集的细胞接种至50 mm平皿中,接种单位为2 000个细胞/皿,置培养箱中培养14 d,使用4%多聚甲醛溶液固定细胞15 min,再加入0.1%结晶紫液染色30 min,用清水清洗3次,室温风干后拍照并计数。

Transwell法检测细胞侵袭和迁移:用无血清的培养液将细胞置24孔Transwell板的上层小室中,将含有10%胎牛血清的培养基加入下层小室,设置3个重复组,培养48 h后取出上层小室,擦拭掉上层未穿过的细胞,用4%多聚甲醛溶液固定穿透细胞15 min,使用0.1%结晶紫液染色30 min,使用倒置相差显微镜,随机选择5个视野,计数被染成紫色的细胞数量。检测细胞迁移和侵袭时,分别使用不含Matrixgel胶和含Matrixgel胶的Transwell小室,其他操作步骤一致。

肿瘤模型构建:利用胰酶将过表达AGTR1的BEL-7404肝癌细胞消化,使用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞,置离心机中离心(转速的1 000 r/min)5 min,用PBS重悬细胞 2×10^6 个/100 μ L,用胰岛素针将细胞悬浮液注射入裸鼠的背部皮下。4周后采用游标卡尺测量并记录肿瘤体积,肿瘤体积按公式 $V = 1/2 \times L \times W^2$ 计算。

免疫组化:将石蜡切片,脱蜡,复水,蒸馏水冲洗后

置PBS中浸泡5 min,抗原修复后使用3% H_2O_2 孵育15~20 min,从而消除内源性过氧化物酶活性。滴加封闭液,于室温下孵育15~20 min,添加适当稀释比例的一抗,于4℃孵育过夜。使用PBS冲洗3次,每次3 min,添加二抗覆盖组织,室温孵育50 min后使用PBS冲洗3次,每次3 min,加入DAB显色液,苏木素复染3 min,冲洗,脱水,透明,封片。

1.3 统计学处理

采用Graphpad 6.0统计学软件分析。采用单因素方差分析进行组间差异的显著性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC中AGTR1与VEGFA表达的关系

374例HCC样本数据集中,AGTR1和VEGFA具有一定相关性($r = 0.27, P < 0.0001$),详见图1A。分析AGTR1表达的前80例($n = \text{high } 80$)和后80例($n = \text{low } 80$)样本与VEGFA的相关性,发现在AGTR1高表达($n = \text{high } 80$)的样本中,AGTR1与VEGFA的相关性增强($r = 0.46, P < 0.0001$),详见图1B;在AGTR1低表达($n = \text{low } 80$)的样本中,AGTR1与VEGFA无相关性($r = -0.00905, P = 0.9365$),详见图1C。选择HCC细胞系BEL-7404细胞转染AGTR1和对照空载质粒,当AGTR1表达量提高时,VEGFA的蛋白水平显著上调($P < 0.001$),详见图1D和图1E。

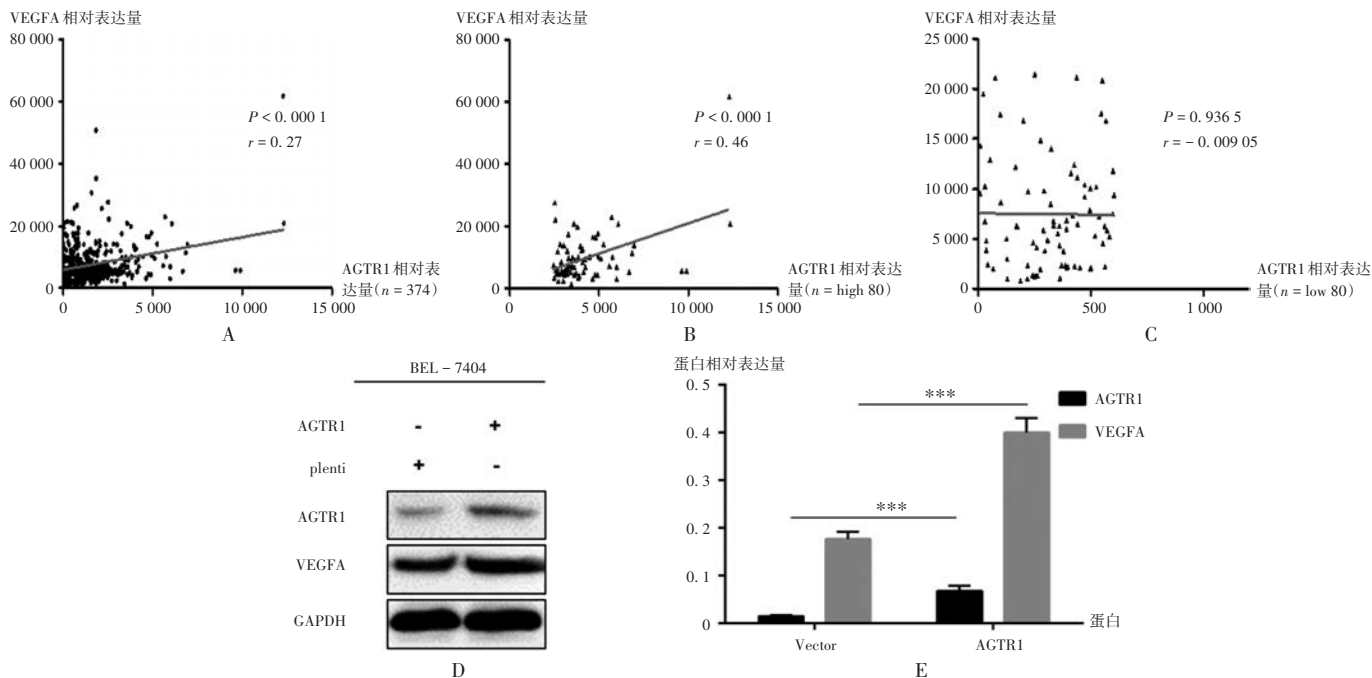
2.2 AGTR1差异表达对BEL-7404细胞生长和体外转移的影响

细胞生长:采用CCK-8法考察BEL-7404细胞转染AGTR1和对照空载质粒后细胞间活力的差异,结果BEL-7404细胞组48 h出现增殖差异($P < 0.05$),随着时间的延长差异更明显(图2A),提示过表达AGTR1的BEL-7404细胞的增殖能力较其对照空载细胞明显增强。克隆形成实验用于检测BEL-7404细胞在过表达AGTR1和对照空载细胞的生长差异,发现过表达AGTR1的BEL-7404细胞的克隆形成能力较其对照空载细胞更强(图2B)。

体外转移:采用Transwell法检测AGTR1差异表达的BEL-7404细胞在迁移和侵袭能力方面的差异,考察AGTR1差异表达对BEL-7404细胞转移能力的影响。结果表明,过表达AGTR1的BEL-7404细胞较其对照空载细胞的体外迁移和侵袭能力均显著增强($P < 0.001$)。详见图2C和图2D。

2.3 抑制AGTR1对VEGFA表达的影响

HCC数据集分析和实验结果均表明,AGTR1与VEGFA的表达在HCC细胞中存在相关性,且AGTR1的过表达能促进BEL-7404细胞的增殖和迁移。使用AGTR1



注: *** $P < 0.001$ 。图2和图3同。

A - C. HCC 数据集中 AGTR1 和 VEGFA 的相关性分析 D - E. AGTR1 过表达的 BEL - 7404 细胞中 VEGFA 的表达变化

图1 BEL - 7404 细胞中 AGTR1 和 VEGFA 间的相关性分析

Note: *** $P < 0.001$ (for Fig. 1 - 3).

A - C. Correlation analysis of AGTR1 and VEGFA in the dataset of HCC D - E. Changes in VEGFA expression in BEL - 7404 cells overexpressing AGTR1

Fig. 1 Correlation analysis between AGTR1 and VEGFA in BEL - 7404 cells

抑制剂洛沙坦,在转染前预先用 50 $\mu\text{mol/L}$ 的洛沙坦处理细胞 2 h,对 BEL - 7404 细胞转染 AGTR1 和对照空载质粒 48 h 后,采用蛋白免疫印迹法考察细胞在洛沙坦处理后 AGTR1 和 VEGFA 蛋白的表达情况。结果发现,洛沙坦能不同程度地抑制 AGTR1 过表达的 BEL - 7404 细胞中 AGTR1 和 VEGFA 的表达($P < 0.01$),对 AGTR1 低表达的 BEL - 7404 细胞中 VEGFA 的表达无影响($P > 0.05$)。详见图 3 A 至图 3 C。

2.4 抑制 AGTR1 对肿瘤生长和血管形成的影响

采用过表达 AGTR1 的 BEL - 7404 细胞构建裸鼠皮下成瘤模型,成瘤 1 周后,给予低、中、高剂量洛沙坦(20, 40, 80 mg/kg),4 周后测量肿瘤体积。结果显示,洛沙坦可以抑制肿瘤的生长,剂量为 20 mg/kg 时,具有不同程度的生长抑制作用($P < 0.05$)。详见图 3 D 和图 3 E。

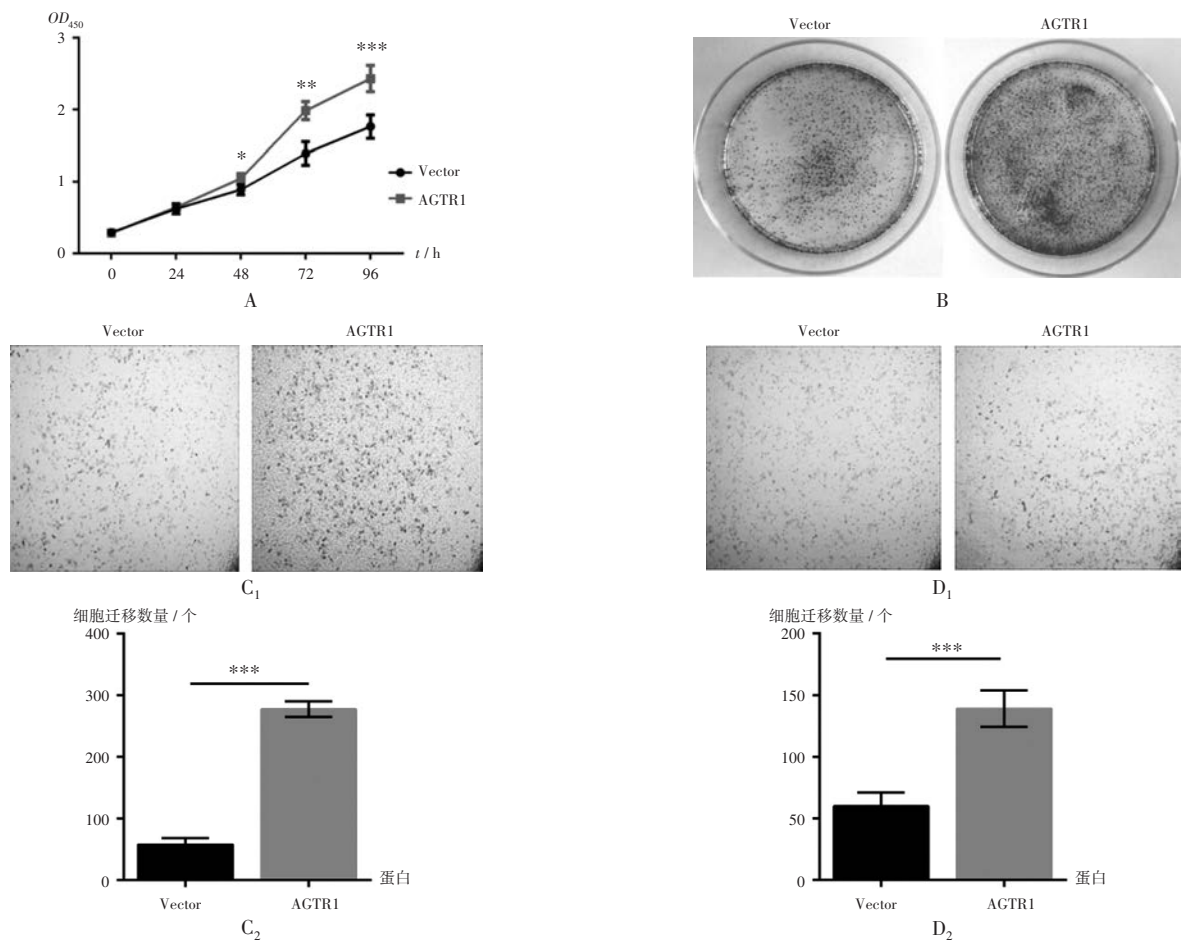
同样按上述处理方式,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测成瘤裸鼠血清 VEGFA 水平,发现不同处理组间血清 VEGFA 水平出现不同程度的差异,当洛沙坦剂量增至 40 mg/kg 时,血清 VEGFA 水平显著下降($P < 0.05$)。详见图 3 F。为了进一步了解洛沙坦对肿瘤血管形成的影响,通过免疫组化法检测 CD_{31} 阳性细胞水平,考察其对肿瘤血管形成的影响。与对照组比较,不同剂量的洛沙坦可不同程度地抑制肿瘤血管形成。详见图 3 G。

3 讨论

血管生成的阻断一直被认为是抑制肿瘤生长的有效机制。目前,大多数获批的一线 and 二线晚期 HCC 的治疗目标是血管生成途径^[13]。VEGF / VEGFRs 信号通路作为参与肿瘤血管生成的重要通路,已作为治疗 HCC 的药物靶点^[14-15]。VEGFA 是血管生成过程如内皮细胞增殖和迁移中最关键的配体^[16-18]。因此,积极寻找有效的靶点抑制剂为肝癌患者的治疗指明了新的方向,通过确定并检测肿瘤标志物对有效诊断和治疗肝癌的重要性也不容忽视^[19-20]。

LI 等^[21]的研究发现,服用 ACEI 可降低患癌风险,但部分学者在相关研究中并未得到类似结果。甚至有研究发现,ARB 的使用可能会增加患癌风险^[22]。上述研究结果的差异可能与患者的种族、服药周期、数据处理方式等因素相关。结合本研究结果,洛沙坦在 AGTR1 过表达的患者中受益可能性更大,故应将患者个体的基因表达谱纳入是否服用 ACEI / ARB 的考虑因素。本研究中发现,AGTR1 与 VEGFA 的表达具有一定相关性,且在高表达 AGTR1 的患者中相关性更强,洛沙坦可以抑制 AGTR1 过表达引起的 VEGFA 表达上调,均表明 AGTR1 过表达在 HCC 细胞增殖、侵袭、血管形成等方面具有重要作用。

综上所述,AGTR1 的过表达可促进 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭,其作用机制可能与增加 VEGFA 表达有关。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。图 3 同。

A. CCK - 8 法考察 AGTR1 差异表达对 BEL - 7404 细胞增殖能力的影响 B. AGTR1 差异表达对 BEL - 7404 细胞克隆形成的影响
C₁ - C₂. Transwell 法考察 AGTR1 差异表达对 BEL - 7404 细胞迁移能力的影响 D₁ - D₂. Transwell 法考察 AGTR1 差异表达达对
BEL - 7404 细胞侵袭能力的影响

图 2 AGTR1 差异表达对 BEL - 7404 细胞生长、迁移和侵袭能力的影响

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (for Fig. 2 - 3).

A. Effects of differential expression of AGTR1 on the proliferation ability of BEL - 7404 cells (CCK - 8 method) B. Effects of differential expression of AGTR1 on the colony formation of BEL - 7404 cells C₁ - C₂. Effects of differential expression of AGTR1 on the migration ability of BEL - 7404 cells(Transwell method) D₁ - D₂. Effects of differential expression of AGTR1 on the invasion ability of BEL - 7404 cells(Transwell method)

Fig. 2 Effects of differential expression of AGTR1 on the growth,migration and invasion of BEL - 7404 cells

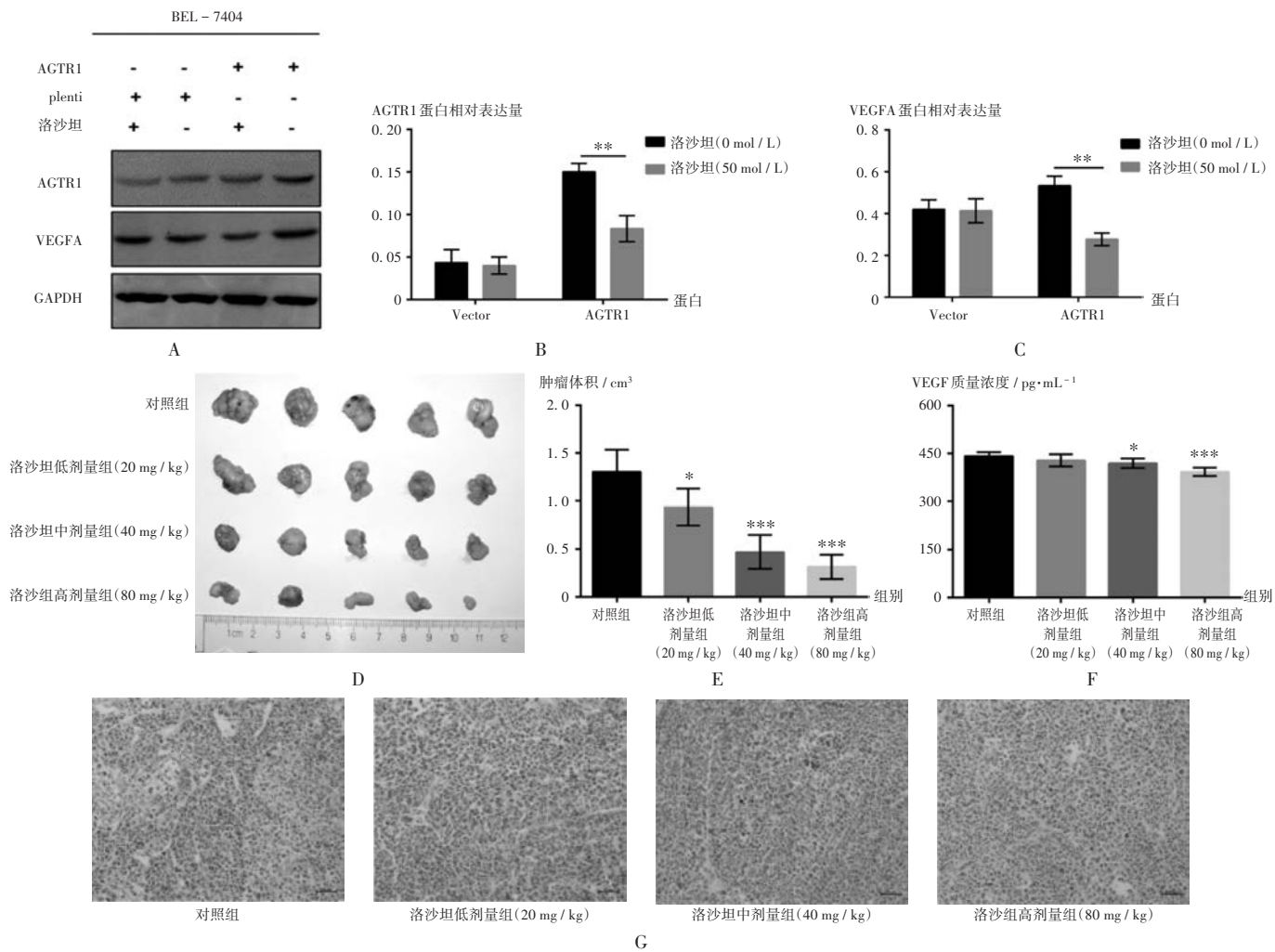
洛沙坦作为靶向 AGTR1 抑制剂,在一定程度上降低了 VEGFA 的水平,可为 ACEI 用于治疗 AGTR1 高表达的 HCC 患者提供参考。

参考文献

[1] ZHU AX,DUDA DG,SAHANI DV,et al. HCC and angiogenesis: Possible targets and future directions[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2011, 8(5):292 - 301.
[2] YANG ZF,POON RT. Vascular changes in hepatocellular carcinoma[J]. Anatomical Record (Hoboken),2008,291(6):721 - 734.
[3] TANAKA S, ARII S. Current status and perspective of anti-angiogenic therapy for cancer: Hepatocellular carcinoma [J]. International Journal of Clinical Oncology,2006,11(2):82 - 89.
[4] LEVER AF,HOLE DJ,GILLIS CR,et al. Do inhibitors of angiotensin - I - converting enzyme protect against risk of cancer?[J].

Lancet, 1998,352(9123):179 - 184.

[5] CHIANG YY, CHEN KB, TSAI TH, et al. Lowered cancer risk with ACE inhibitors / ARBs: A population - based cohort study[J]. Journal of Clinical Hypertension (Greenwich), 2014, 16(1): 27 - 33.
[6] OKAZAKI M,FUSHIDA S,HARADA S,et al. The angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan suppresses proliferation and fibrosis in gastric cancer[J]. Cancer Letters, 2014, 355(1): 46 - 53.
[7] PARK YA,CHOI CH,DO IG,et al. Dual targeting of angiotensin receptors (AGTR₁ and AGTR₂) in epithelial ovarian carcinoma[J]. Gynecologic Oncology, 2014, 135(1):108 - 17.
[8] OH E, KIM JY, CHO Y, et al. Overexpression of angiotensin II type 1 receptor in breast cancer cells induces epithelial - mesenchymal transition and promotes tumor growth and angiogene-



A - C. 洛沙坦对 AGTR1 差异表达的 BEL - 7404 细胞中 AGTR1 和 VEGFA 表达的影响 D - E. 洛沙坦对过表达 AGTR1 的 BEL - 7404 细胞裸鼠成瘤的影响 F. ELISA 法检测洛沙坦对裸鼠血清中 VEGFA 水平的影响 G. 洛沙坦对肿瘤血管形成的影响 (× 200)

图 3 洛沙坦对 BEL - 7404 细胞中 AGTR1 和 VEGFA 表达的影响

A - C. Effects of losartan on the expression of AGTR1 and VEGFA in BEL - 7404 cells with differential expression of AGTR1 D - E. Effects of losartan on the tumorigenesis of BEL - 7404 cells overexpressing AGTR1 in nude mice F. Effects of losartan on the VEGFA level in serum of nude mice (ELISA method) G. Effects of losartan on tumor angiogenesis (× 200)

Fig. 3 Effects of losartan on the expression of AGTR1 and VEGFA in BEL - 7404 cells

sis[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(6 Pt A): 1071 - 1081.

[9] UEMURA H, ISHIGURO H, NAGASHIMA Y, et al. Antiproliferative activity of angiotensin II receptor blocker through cross-talk between stromal and epithelial prostate cancer cells [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2005, 4(11): 1699 - 1709.

[10] INO K, SHIBATA K, KAJIYAMA H, et al. Angiotensin II type 1 receptor expression in ovarian cancer and its correlation with tumour angiogenesis and patient survival[J]. British Journal of Cancer, 2006, 94(4): 552 - 560.

[11] CARBAJO - LOZOYA J, LUTZ S, FENG YX, et al. Angiotensin II modulates VEGF - driven angiogenesis by opposing effects of type 1 and type 2 receptor stimulation in the microvascular endothelium [J]. Cellular Signalling, 2012, 24(6): 1261 - 1269.

[12] 陈德志, 陈巧辉, 陈惠萍, 等. 阿帕替尼在原发性肝癌治疗中的应用研究进展[J]. 中国药业, 2019, 28(12): 128 - 31.

[13] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301 - 1314.

[14] LLOVET JM, RICCI S, MAZZAFERRO V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. The New England Journal of Medicine, 2008, 359(4): 378 - 390.

[15] ZHU AX, PARK JO, RYOO BY, et al. Ramucirumab versus placebo as second - line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma following first - line therapy with sorafenib (REACH): A randomised, double - blind, multicentre, phase 3 trial[J]. The Lancet Oncology, 2015, 16(7): 859 - 870.

[16] TAMMELA T, ENHOLM B, ALITALO K, et al. The biology of vascular endothelial growth factors[J]. Cardiovascular Research, 2005, 65(3): 550 - 563.

[17] LEUNG DW, CACHIANES G, KUANG WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [J]. Science, 1989, 246(4935): 1306 - 1309.