

AT1-R siRNA 对雌激素诱导的 Ishikawa 细胞生物学行为的影响*

苏卿^① 杨清^② 潘卓^①

摘要 目的:通过转染小干扰RNA(siRNA)沉默血管紧张素受体1(angiotensin receptor 1, AT1R)的表达来研究其对雌激素诱导的 Ishikawa 细胞增殖和细胞周期及凋亡的影响。**方法:**免疫荧光检测 AT1R 在子宫内膜癌 Ishikawa 细胞中的表达,转染 AT1-R siRNA, Western blot 检测转染前后 Ishikawa 细胞中 AT1R 蛋白的表达。MTT 检测雌激素诱导 Ishikawa 细胞的增殖及雌激素诱导的雌激素受体抑制剂作用下转染前后 Ishikawa 细胞的增殖, Western blot 检测细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2)表达。**结果:**免疫荧光检测 AT1R 表达于 Ishikawa 细胞,转染 AT1-R siRNA 72 h 后 AT1R 蛋白表达降低最显著,降低 82.40%($P<0.05$),为此检测转染 72h 后细胞增殖周期及凋亡, MTT 结果显示,雌激素能诱导 Ishikawa 细胞增殖,封闭雌激素受体后雌激素诱导的 Ishikawa 细胞增殖受到抑制,封闭雌激素受体后雌激素诱导的转染组细胞增殖较未转染组受到明显抑制;流式细胞周期结果显示,雌激素受体封闭后雌激素诱导的转染组细胞较未转染组 S 期减少,凋亡增多($P<0.05$),其 ERK1/2 表达较未转染组明显降低($P<0.05$)。**结论:**AT1R 可促进雌激素诱导的 Ishikawa 细胞增殖,其机制可能与 ERK1/2 表达下降有关。

关键词 Ishikawa 细胞 siRNA 细胞增殖 细胞周期 AT1-R

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.22.021

Effect of AT1R Knockdown on Ishikawa Cell Proliferation Induced by Estrogen

Qing SU, Qing YANG, Zuo PAN

Correspondence to: Qing YANG; Email: yangq@sj-hospital.org

Department of Obstetrics and Gynecology, Jilin Provincial Tumor Hospital, Jilin 130012, China

Department of Obstetrics and Gynecology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China

This work was supported by funds from the Shenyang Science and Technology Plan Projects (071219) and Liaoning Baiqianwan Talents Program (2008921066)

Abstract Objective: To investigate the role of angiotensin II type 1 in the estrogen-induced proliferation, cell cycle, and apoptosis in endometrial carcinoma cell line Ishikawa by transfection of siRNA-AT1R. **Methods:** The expression of Angiotensin Receptor 1 (AT1-R) was identified using immunofluorescence assay. The expression of AT1-R protein was examined by Western blotting before and after transfection. The effect of AT1-R silence on 17 β -E2-induced proliferation of cell line Ishikawa was measured by MTT assay, whereas the expression of ERK1/2 protein was examined by Western blotting. **Results:** After transfection with AT1-R siRNA plasmid for 72 hours, the expression of AT1-R protein significantly decreased by 82.40% ($P<0.05$). AT1-R blocking inhibited the proliferation of Ishikawa cells treated with 17 β -E2, whereas AT1-R silencing further inhibited the proliferation. AT1-R silence reversed the promotion of 17 β -E2 on the cell cycle transformation of Ishikawa and decreased the number of S-phase cells ($P<0.05$). The apoptotic cells increased. ERK1/2 expression decreased in the transfection group. **Conclusion:** AT1-R plays an important role in 17 β -E2-induced proliferation of endometrial carcinoma cell line Ishikawa and could be related to the decrease in the expression of ERK1/2.

Keywords Cell line Ishikawa; siRNA; Cell proliferation; Cell cycle; AT1-R

子宫内膜癌目前已经成为发病率最高的女性恶性盆腔生殖道肿瘤,约占女性癌症的7%,严重威胁女性健康。目前多数学者根据子宫内膜癌对雌激素的依赖与否,将子宫内膜癌分为雌激素依赖型(N型)和非雌激素依赖型(O型),两种类型的生物学行为及预后有所不同。后者发病率虽低,但转移早、预后

差、恶性度高、临床行为差。目前有关子宫内膜癌发病机制用经典的激素-受体学说难以解释。大量流行病学调查和临床证据^[1-2]表明:长期高水平雌激素刺激与子宫内膜癌发病关系密切;高血压、糖尿病和肥胖为子宫内膜癌三联征,高血压患者一般血管紧张素 II (Ang II)表达上调,具有促进肿瘤细胞增殖

作者单位:①吉林省肿瘤医院妇产科(长春市130012);②中国医科大学附属盛京医院妇产科

*本文课题受沈阳市科学技术计划项目基金(编号:071219)和辽宁省百千万人才工程项目(编号:2008921066)资助

通信作者:杨清 yangq@sj-hospital.org

和肿瘤血管形成并抑制肿瘤细胞分化的功能,其作用是通过位于靶细胞表面的特异性 I 型受体(AT1R)实现的。有研究^[3]发现其抑制剂坎地沙坦能抑制胰腺癌细胞增殖,Rivera 报道^[3]洛沙坦能降低胃癌细胞的增殖,有研究证实雌激素可通过 AT1R 激活雌激素受体阴性的 SKBR3 乳腺癌细胞系中的 MAPK 活性,为此本研究拟探讨其在子宫内膜癌中的作用。本研究组前期研究发现子宫内膜癌组织中存在 AT1-R 的表达,本研究以子宫内膜癌 Ishikawa 细胞为研究对象,用免疫荧光技术检测 AT1-R 在 Ishikawa 细胞中的表达,雌激素受体抑制剂封闭 ER 受体后,通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术将 AT1-R 基因沉默来观察其对 Ishikawa 细胞增殖、周期及凋亡的影响,为子宫内膜癌雌激素非受体依赖机制的研究提供实验依据,并可能为子宫内膜癌的治疗提供新的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞,水溶性 17 β -雌激素、雌激素受体抑制剂 ICI182780、四甲基亚唑蓝(MTT)和碘化丙啶(PI)购自美国 Sigma 公司,兔抗人 AT1-R 抗体购于北京博奥森生物公司,AT1-R siRNA 由上海吉凯基因化学技术有限公司合成并进行荧光标记,Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司,G418 购自德国 Merck 公司,ERK 鼠抗人单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Ishikawa 细胞由本院中心实验室冻存,复苏后以含 10%胎牛血清、100 μ L/mL 青霉素和 100 μ L/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养液,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂恒温培养箱中培养,接种 48~72 h 细胞进入对数生长期,待细胞长至瓶底 80%~90%时,用 0.25%的胰酶将贴壁生长的细胞消化 1~2 min,显微镜下观察细胞变圆变亮时,轻轻吹打将其传代,经检测细胞雌激素受体和孕激素受体阳性,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 免疫荧光 将 500 μ L 密度为 2×10^5 /L 的细胞悬液滴于处理过的无菌小盖玻片上,静止后于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂恒温培养箱中培养约 24 h,观察细胞密度,40g/L 甲醛固定,正常羊血清处理后加入兔抗人 AT1-R 多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜后加入山羊抗兔 FITC-IgG 抗体,DAPI 染核 5 min,各步骤间均用 PBS (pH 7.14)充分振洗,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.3 筛选有效的 siRNA 1) siRNA 的设计准备:在 GenBank 中检索人 AT1-R mRNA 序列(编号 NM-032049),选择不同位点设计 3 对 AT1-R siRNAs,以上序列经

序列相似性软件比对不与任何已知基因有同源性。AT1-R siRNAs 由上海吉凯基因化学技术有限公司合成并进行荧光标记。AT1-R siRNA-1 正义链:5'-CA GTTTGTGCTTTCCATTA-3',AT1-R siRNA-2 正义链:5'-GTAGTGTCTTCCTAGTATA-3'; AT1-R siRNA-3 正义链:5'-GTATGCCTTCCTGTTTAAA-3'。阴性对照 siRNA 由该公司提供,使用前用稀释液将其稀释成 0.1 μ g/ μ L 的工作母液,所有的 siRNA 均经过变性和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化,去除未配对单链。**2) 脂质体介导 AT1-R siRNA 转染细胞:**接种 Ishikawa 细胞于 6 孔板中,培养 24 h,贴壁细胞达到 80%以上,siRNA 用 Opti-MEM 稀释,使之加入 6 孔板中的终浓度为 6×10^{-3} 、 8×10^{-3} 、 11×10^{-3} μ g/ μ L, Lipofectamine™ 2000 亦用 Opti-MEM 稀释,操作按照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行。**3) 荧光显微镜检测 si-RNA 的转染效率:**在转染 6h 后,换含 10%胎牛血清培养液培养,分别在 24、48 和 72 h 时荧光显微镜观察不同浓度 siRNA 转染情况,成功转染的细胞可观察到绿色荧光蛋白的绿色荧光散在分布在细胞质中。**4) Western blot 检测转染后 AT1-R 蛋白质的表达:**选定荧光显微镜结果筛选出的有效的 siRNA 浓度,转染 1 对 siRNA,分别于 24、48 和 72 h 后提取蛋白质,用 Western blot 方法检测各实验组 AT1-R 蛋白质的表达,从而筛选出最佳的作用时间。根据以下公式计算蛋白表达抑制率:抑制率(%)=(1-转染组平均灰度值/未转染组平均灰度值)×100%。

1.2.4 观察 AT1-R siRNA 对雌激素诱导的雌激素受体抑制剂封闭的 Ishikawa 细胞增殖的影响 取对数生长期细胞,离心计数,以浓度 8×10^3 个/200 μ L,以 200 μ L 接种于 96 孔板,设空白对照组、DMEM 培养液对照组(A 组),雌激素诱导组(B 组),雌激素诱导雌激素受体抑制剂封闭组(C 组),雌激素诱导雌激素受体抑制剂封闭 AT1-R siRNA 转染组(D 组),每组设 5 个复孔,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂恒温培养箱中培养 24 h。siRNA 组按照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行转染,在转染后 72 h 后对其中 1 组加入雌激素终浓度为 10^{-8} mol/L,设为雌激素组;雌激素受体抑制剂浓度为 10^{-7} mol/L。雌激素作用 10 min 后,弃培养液和药物,用 PBS 洗 1~2 次,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μ L,继续培养 4 h 后弃上清,每孔加入 DMSO 150 μ L 终止反应,轻微震荡至结晶完全溶解,酶标仪测定 490 nm 吸光度值。计算各组的抑制率=[1-(OD 处理-OD 调零)/(OD 对照-OD 调零)]×100%,对照组 A 值×100%。

1.2.5 PI 染色流式细胞技术检测 AT1-R siRNA 对雌激素诱导的雌激素受体抑制剂封闭的 Ishikawa 细胞周期和细胞凋亡率 将 Ishikawa 细胞接种于 6 孔板

中,设立对照组,用筛选好浓度的有效 siRNA 转染 Ishikawa 细胞后 72 h, C 组和 D 组雌激素终浓度为 10^{-8} mol/L, 雌激素受体抑制剂终浓度为 10^{-7} mol/L, 作用 10 min 后收集两组细胞, 加入预冷的 5 mL 70% 的乙醇中, 封口膜封口, 4℃ 过夜, 加入 RNase-A 3 μ L 至浓度为 50 μ g/mL, 37℃ 水浴消化 30 min, 加 PI 76 μ L 至终浓度为 100 μ g/mL, 在冰浴中避光染色 30 min 后, 上流式细胞仪检测(激发波长 488 nm, 发射波长 610 nm)各期细胞 DNA 含量和凋亡率, 测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理。

1.2.6 Western blot 检测 AT1-R siRNA 对雌激素诱导的雌激素受体抑制剂封闭的 Ishikawa 细胞中 ERK1/2 蛋白表达 按上述方法处理对照组、转染组和雌激素组细胞, PBS 洗 2 次, 每孔细胞用裂解液 50 μ L, 等量蛋白在 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中分离, 并转至 PVDF 膜, 用以 TBS 溶解的 5% 脱脂奶粉在室温封闭 1 h, 加入兔抗人 ERK1/2 多克隆抗体 (1:1 000), 4℃ 摇床过夜, TBST 洗膜, 再用 HRP-羊抗兔 IgG (1:10 000) 二抗室温摇床孵育 2 h, TBST 洗膜后, 特异性的反应条带通过化学发光系统显色, 结果由 BIO-RAD 图像分析仪分析。

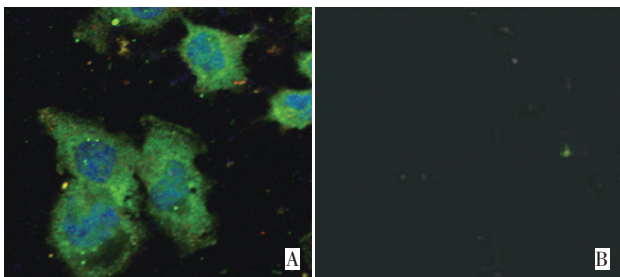
1.3 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用方差分析及 SNK 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光结果

2.1.1 AT1-R 抗体免疫荧光结果 在荧光显微镜下观察(图 1), 可见实验组 Ishikawa 细胞膜和细胞质染成绿色, 为阳性, 细胞核染成蓝色。对照组细胞不着色。



A: Ishikawa 细胞; B: 阴性对照

图 1 荧光显微镜观察 AT1-R 表达(S-P \times 400)

Figure 1 Observation of AT1R expression on Ishikawa cell membrane and inside the cytoplasm under fluorescence microscope(S-P \times 400)

2.1.2 荧光标记的 siRNA(GFP-siRNA)转染结果 在转染 24、48 和 72 h 后, 荧光显微镜下观察, 发出绿色荧光的细胞表示 siRNA 已成功转染入细胞内, 可大致判断

3 个时间 siRNA 的转染效率, 其中 siRNA-AT1R3-GFP 转染效率最高, siRNA 有效浓度 8×10^{-3} μ g/ μ L。

2.2 AT1-R siRNA 对 Ishikawa 细胞 AT1-R 蛋白表达的影响

在转染后经荧光观察初步确定了 siRNA A-AT1R3-GFP 的转染效率较高, 在转染 siRNA 后分别在 24、48 和 72 h 收集蛋白。Western blot 结果显示: 与对照组相比, 实验组的 AT1-R 蛋白条带在 24、48 和 72 h 的抑制率分别为 32.82%、52.47% 和 82.40%, AT1R-siRNA 可在蛋白质水平抑制 AT1-R 蛋白的表达, 且 72 h 抑制最明显(图 2)。

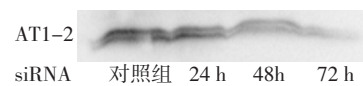


图 2 Western blot 检测不同转染时间的 AT1R 蛋白表达

Figure 2 Reduced AT1R expression after siRNA transfection at different points-in-time detected by Western blot assay

2.3 AT1-R siRNA 对雌激素诱导的 Ishikawa 细胞增殖的影响

MTT 法检测转染 siRNA 后的各组细胞的吸光值, 根据存活细胞数量与吸光值成正比的原理, 按细胞存活率(实验组 OD/对照组 OD \times 100%)计算, D 组为 -23.04%, C 组为 -7.47%, 从相对增殖率上, 表明转染后细胞增殖低于雌激素受体封闭的雌激素诱导组(表 1)。

表 1 AT1-R SiRNA 对雌激素诱导的 Ishikawa 细胞增殖的影响
Table 1 Effects of AT1R-SiRNA on the estrogen-induced proliferation of cell line Ishikawa

组别	OD	PR (%)
对照组(A组)	0.255 0 \pm 0.006 2	-
雌激素组(B组)	0.295 4 \pm 0.005 7* [△]	25.56
雌激素+ICI182780组(C组)	0.243 2 \pm 0.006 1* [△]	-7.47
雌激素+ICI182780+siRNA-AT1R(D组)	0.218 6 \pm 0.009 7* [△]	-23.04

*与 A 组比较, $P < 0.05$; [△]与 D 组比较, $P < 0.01$; PR: 相对于 A 组的增殖率

2.4 PI 染色流式细胞技术检测 AT1-R siRNA 对雌激素诱导的雌激素受体抑制剂封闭的 Ishikawa 细胞周期和细胞凋亡率的影响

1) 细胞经 PI 染色后, 用流式细胞仪分析凋亡细胞可在 G₀/G₁ 期前形成一个亚二倍体凋亡峰, C 组凋亡率为 12.93%, 转染 AT1-R siRNA-3 72 h 后, D 组凋亡率为 19.67%, 表明转染 AT1-R siRNA 后可促进 Ishikawa 细胞凋亡, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。2) 流式细胞仪检测细胞周期变化, siRNA 作用后 G₀/G₁ 期细胞两组差异无统计学意义, D 组 S 期比例减少, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), G₂/M 期变化不大(表 2)。

表2 AT1-R siRNA对雌激素诱导的Ishikawa细胞周期的影响 %

Table 2 Effects of AT1R-siRNA on estrogen-induced cell cycle of cell Ishikawa(%)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期	凋亡
雌激素+ICI182780组(C组)	36.4 ± 1.25	44.47 ± 0.69	22.13 ± 3.75	12.93 ± 0.10
雌激素+ICI182780+AT1-R siRNA组(D组)	36.1 ± 0.62	40.03 ± 1.19*	23.85 ± 1.80	19.67 ± 0.42*

*与C组比较, P<0.01

2.5 Western blot 检测 AT1-R siRNA 对雌激素诱导雌激素受体抑制剂封闭的 Ishikawa 细胞中 ERK1/2 蛋白表达

取雌激素诱导雌激素受体抑制剂封闭转染 AT1-R siRNA 前后的 Ishikawa 细胞, Western blot 检测 ERK1/2 蛋白表达变化, 其中转染 AT1-R siRNA 组 ERK1/2 表达明显下降, 抑制率 20.84%(图 3)。

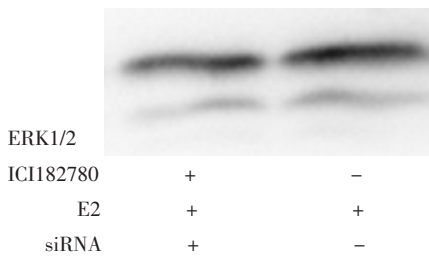


图3 Western blot 检测不同转染时间的 ERK 蛋白表达

Figure 3 The ERK1/2 expression in the three groups

3 讨论

本课题组之前在子宫内膜癌组织中发现 AT1-R 的表达, 有报道其在人不同的恶性肿瘤组织里有表达, 如乳腺癌^[4]、皮肤癌^[5]、胰腺癌、恶性胶质瘤^[6]、喉癌、肝癌和前列腺癌、肾癌和肺转移癌等^[7], 妇科恶性肿瘤中的宫颈癌、绒毛膜癌^[8]和卵巢癌^[9], 可见 AT1-R 在很多人类恶性肿瘤中存在, 可能在肿瘤的发生发展中起重要作用。长期应用血管紧张素 II 受体抑制剂有抑癌作用, 有研究显示在中国妇女中血管紧张素酶 I 基因和 AT1R 基因具有多态性, Ang II 是某些癌细胞系强有力的促生长因子, 通过 AT1R 影响肿瘤细胞增殖和血管生成^[10]。在动物实验中亦有研究说明 AT1R 抑制剂能抑制肿瘤生长、转移和血管生成, 表明其有可能在治疗肿瘤上提供新的方向^[11-12]。有研究证实雌激素可通过 AT1R 激活 ER(-) 的 SKBR3 乳腺癌细胞系中的 MAPK 活性, 子宫内膜癌和乳腺癌有类似的发病机理, 为此本实验检测 AT1R 在子宫内膜癌细胞 Ishikawa 中的表达, 并进一步采用小干扰 RNA 方法沉默 AT1-R mRNA, 再用雌激素诱导、雌激素受体抑制剂封闭来分析其在细胞增殖、周期和凋亡中的作用。

小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 或沉

默 RNA (silencing RNA), 是有 20~25 个核苷酸的双股 RNA, 目前已知 siRNA 主要参与 RNA 干扰现象, 将其用转染技术导入细胞内, 并对特异基因产生具有专一性的敲除效果, 来调节基因的表达, 目前在基因功能、基因治疗及微生物学等领域得到了广泛应用。本实验选用 pRNA-U6.1/Neo siRNA 载体, 用 GFP 标记 siRNA, 便于用荧光显微镜分析 siRNA 进入细胞及在细胞中的定位。研究证实, 不同位点的 siRNAs 具有不同的干扰效率, 本实验设计了 3 对针对 AT1-R 的 siRNAs 进行筛选, 以保证干扰效果。通过荧光显微镜观察初步筛出 siRNA 浓度为 $8 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 进一步检测蛋白质水平基因抑制情况, 以确定其有效性。在转染多数哺乳动物 siRNA 后, 基因的抑制高峰时间为 48~72 h, 本实验选择 24、48 和 72 h, 结果显示在 24h 出现了蛋白质水平的抑制, 在 72 h 抑制率达 82.40%, 表明本实验设计的 siRNA 能有效抑制 AT1-R 基因的表达。Arrieta 等^[13]实验结果表明: AT1R 阻滞剂 Losartan 可以诱导神经胶质瘤的细胞 C6 凋亡和抑制神经胶质瘤的生长(体内), 为明确 AT1-R 基因与 Ishikawa 细胞增殖、周期和凋亡的相关性, 本研究采用 MTT 和流式细胞技术进行检测, 结果表明, 在有效抑制 AT1-R 基因表达同时封闭雌激素受体的 Ishikawa 细胞增殖受到明显抑制, 与 Uemura 等^[12]阻断 AT1-R 可抑制前列腺癌细胞增殖的研究相一致; 转染 AT1-R siRNA 后同时封闭雌激素受体的 Ishikawa 细胞凋亡被明显促进, 与 Arrieta 等^[14]在前列腺癌中的研究一致, 并首次应用 AT1-R 拮抗剂坎地沙坦治疗激素抵抗的前列腺癌患者, 取得了较好的疗效。另外, Dolley-Hitze 等^[15]提出阻断 AT1R 与 AT2R 可能为治疗肾透明细胞癌的新方向。本研究在细胞周期分析中表明转染后雌激素受体封闭的 Ishikawa 细胞的 S 期降低, G₂/M 期变化不明显, 推测沉默 AT1-R 可能抑制了 G₀/G₁ 期向 S 期转化过程; 前期研究表明^[16]雌激素诱导 Ishikawa 细胞能使 G₀/G₁ 期降低, S 期增高, G₂/M 期变化不明显, 表明雌激素在短时间内能促进 Ishikawa 细胞增殖、细胞周期的转化, 此次同时雌激素受体抑制剂及沉默 AT1-R 基因都能在短时间内使其增殖受到抑制, 在这样较短的时间内难以完成转录、翻译、蛋白合成等过程, 推测其作用

可能通过快速激活细胞内传导信号实现的,雌激素能使多肽生长因子受体磷酸化,多肽生长因子受体磷酸化是ERK信号通路激活的重要始动环节,本研究检测ERK1/2蛋白的表达,在雌激素诱导10 min后ERK1/2蛋白表达水平显著升高,由此推断其快速促增殖作用可能与MAPK信号系统激活有关。本实验中封闭了雌激素受体,因此这种促增殖作用不同于经典的激素-受体学说。有研究^[17]表明,在前列腺癌中AT1-R与MAPK、ERK和STAT3有关,也有研究表明p-ERK能通过上调CyclinD1表达,促进细胞增殖;通过上调抗凋亡蛋白Survivin、Bcl-2,下调抗凋亡水解蛋白酶Caspase9,对细胞起抗凋亡作用,在Ishikawa中的机制本研究组将作进一步研究。

综上所述,有研究^[16-20]证实雌激素能够短时间内明显促进Ishikawa细胞增殖,本实验将AT1-R基因沉默之后,同时用雌激素诱导及雌激素受体抑制剂封闭观察这种增殖作用是否有影响,结果发现,应用siRNA干扰AT1-R表达后对雌激素诱导及雌激素受体抑制剂封闭的Ishikawa细胞增殖有抑制作用,即雌激素可通过AT1-R促使Ishikawa细胞增殖而不通过雌激素受体。提示雌激素可能通过AT1-R促进子宫内膜癌细胞增殖,进而为子宫内膜癌尤其是II型子宫内膜癌分子治疗提供依据。

参考文献

- 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.
- Egami K, Murohara T, Shimada T, et al. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(1):67-75.
- Rivera E, Arrieta O, Guevara P, et al. AT1 receptor is present in glioma cells; its blockage reduces the growth of rat glioma[J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(9):1396-1399.
- Koh WP, Yuan JM, Van Den Berg D, et al. Polymorphisms in angiotensin II type 1 receptor and angiotensin I-converting enzyme genes and breast cancer risk among Chinese women in Singapore[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(2):459-464.
- Takeda H, Kondo S. Differences between squamous cell carcinoma and keratoacanthoma in angiotensin type-1 receptor expression[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(5):1663-1637.
- Juillerat-Jeanneret L, Celerier J, Chapuis Bernasconi C, et al. Renin and angiotensinogen expression and functions in growth and apoptosis of humangioblastoma[J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(5):1059-1068.
- Miyajima A, Kosaka T, Asano T, et al. A Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(15):4176-4179.
- Ino K, Uehara C, Kikkawa F, et al. Enhancement of aminopeptidase A expression during angiotensin II-induced choriocarcinoma cell proliferation through AT1 receptor involving protein kinase C- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(8):3973-3982.
- 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]. *Br J Cancer*, 2006, 94(4):552-560.
- Vinson GP, Barker S, Puddefoot JR. The renin-angiotensin system in the breast and breast cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2012, 19(1):1-19.
- Arrieta O, Guevara P, Escobar E, et al. Blockage of angiotensin II type I receptor decreases the synthesis of growth factors and induces apoptosis in C6 cultured cells and C6 rat glioma[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(7):1247-1252.
- Uemura H, Ishiguro H, Nakaigawa N, et al. Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(11):1139-1147.
- Arrieta O, Guevara P, Escobar E, et al. Blockage of angiotensin II type I receptor decreases the synthesis of growth factors and induces apoptosis in C6 cultured cells and C6 rat glioma[J]. *Br J Cancer*, 2005,92(7):1247-1252.
- Arrieta O, Guevara P, Escobar E, et al. Blockage of angiotensin II type I receptor decreases the synthesis of growth factors and induces apoptosis in C6 cultured cells and C6 rat glioma [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(7):1247-1252.
- Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B, et al. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma[J]? *Br J Cancer*, 2010, 103(11):1698-1705.
- 苏卿,杨清.血管紧张素II受体抑制剂对雌激素诱导的Ishikawa细胞的增殖及凋亡的影响[J]. *中国医科大学学报*,2010,39(9):733-736.
- Bose SK, Gibson W, Giri S, et al. Angiotensin II up-regulates PAX2 oncogene expression and activity in prostate cancer via the angiotensin II type I receptor[J]. *Prostate*, 2009, 69(12):1334-1342.
- 潘卓,杨清,苏卿.AT1-R在雌激素诱导子宫内膜癌细胞增殖中的作用[J].*中国肿瘤临床*,2011,38(2):61-65.
- 李景溪,杨清.AT1-R对非雌激素依赖型子宫内膜癌Hec-1A细胞增殖及凋亡的影响[J].*现代肿瘤医学*,2012,20(2):242-245.
- 殷丽丽,杨清,王玉,等.血管紧张素II受体1抑制剂对雌激素作用下的子宫内膜癌细胞增殖和凋亡的影响[J].*中国医科大学学报*, 2010,39(6):447-451.

(2011-09-22收稿)

(2012-08-07修回)

(本文编辑:邢颖)