

• 论 著 •

ANG 及其突变体对膀胱癌血管生成的影响及分子机制研究

刘玉林¹, 黄晓楠¹, 向 玉¹, 陈俊霞^{2△}

1. 四川省遂宁市中心医院检验科, 四川遂宁 629000; 2. 重庆医科大学细胞生物学与遗传学教研室, 重庆 400016

摘 要: **目的** 探讨血管生成素(ANG)及其突变体对膀胱癌血管生成的影响及作用机制。 **方法** 构建 ANG 突变质粒(BIU87-ANG^{H13R}、BIU87-ANG^{H114R}), 与 BIU87-ANG 组成实验组, BIU87-C1 为对照组。采用 pEGFP-C1-ANG^{H13R}、pEGFP-C1-ANG^{H114R}、pEGFP-C1-ANG 及 pEGFP-C1 稳定转染膀胱癌 BIU87 细胞, 构建稳定转染细胞系; 采用蛋白质印迹法(Western blot)检测磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路中的相关靶蛋白; 采用鸡胚尿囊绒毛膜(CAM)血管生成实验和小管形成实验检测 ANG 及其突变体对膀胱癌血管生成的影响; 采用双荧光素酶报告基因系统检测过表达核糖核酸酶抑制因子时核糖体 RNA(rRNA)的转录活性。 **结果** 稳定转染 ANG 及其突变体的膀胱癌 BIU87 细胞系构建成功; 当 ANG 及突变体过表达时, 磷酸化 PI3K、磷酸化 GSK3(α/β)、磷酸化 AKT、磷酸化 mTOR、磷酸化 PTEN 水平增加; CAM 血管生成实验和小管形成实验结果表明, 实验组(BIU87-ANG^{H13R}、BIU87-ANG^{H114R}、BIU87-ANG)CAM 血管生成及小管形成均明显多于对照组(BIU87-C1), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 双荧光素酶报告基因结果表明过表达核糖核酸酶抑制因子抑制 rRNA 的转录活性。 **结论** ANG 及其突变体可能通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进膀胱癌肿瘤血管生成。

关键词: 血管生成素; 突变体; 膀胱癌; 血管

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.11.008

中图法分类号: R737.14

文章编号: 1673-4130(2023)11-1317-06

文献标志码: A

Effect of ANG and its mutants on bladder cancer angiogenesis and molecuLar mechanism

LIU Yulin¹, HUANG Xiaonan¹, XIANG Yu¹, CHEN Junxia^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Suining, Suining, Sichuan 629000, China;

2. Department of Cell Biology and Genetics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of angiogenin (ANG) and its mutants on bladder cancer angiogenesis and mechanism. **Methods** ANG mutant plasmids (BIU87-ANG^{H13R}, BIU87-ANG^{H114R}) were constructed and stably transfected into bladder cancer cell line BIU87. BIU87-ANG^{H13R}, BIU87-ANG^{H114R} and BIU87-ANG were the experimental group, and BIU87-C1 was the control group. pEGFP-C1-ANG^{H13R}, pEGFP-C1-ANG^{H114R}, pEGFP-C1-ANG and pEGFP-C1 were stably transfected into bladder cancer BIU87 cells to construct a stable transfected cell line. The target proteins of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway were detected by Western blot. The effect of ANG and its mutants on the angiogenesis of bladder cancer was detected by chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) angiogenesis assay and tubule formation assay. The transcriptional activity of ribosomal RNA (rRNA) was detected by dual luciferase reporter gene system when ribonuclease inhibitor was overexpressed. **Results** The bladder cancer BIU87 cell line stably transfected with ANG and its mutants were successfully constructed. It was found that the expressions of phosphorylated proteins p-PI3K, p-AKT, p-GSK3 (α/β), p-PTEN and p-mTOR increased when ANG and its mutants were overexpressed. CAM angiogenesis assay and tube formation assay showed that the CAM angiogenesis and tube formation in the experimental group (BIU87-ANG^{H13R}, BIU87-ANG^{H114R}, BIU87-ANG) were higher than those in the control group (BIU87-C1), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The dual luciferase reporter gene detection system showed that over-expression ribonuclease inhibitor inhibited the transcriptional activity of rRNA. **Conclusion** ANG and its mutants may promote bladder cancer angiogenesis through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

Key words: angiogenin; mutant; bladder cancer; blood vessels

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一, 其发病率居我国泌尿系统肿瘤第一位^[1]。相关数据显示,

2020 年全球新增膀胱癌确诊病例约 5.73 万例,占全部恶性肿瘤新发病例的 3.0%,死亡约 2.13 万例,占全部恶性肿瘤死亡病例的 2.1%^[2]。血管生成素(ANG)是非常重要的血管生成因子,由 147 个氨基酸组成,包含一段信号肽序列,具有弱 RNA 酶活性^[3]。ANG 在多种实体瘤中表达升高,研究表明其与血管生成及肿瘤发生发展密切相关^[4],新生血管形成可促进肿瘤的发生发展。ANG 可以通过调节黏附因子表达^[5]及免疫细胞^[6-7]参与免疫反应,也可通过调节肿瘤血管变化^[8]间接参与免疫反应。本文主要探索 ANG 及其突变体对膀胱癌血管生成的影响和作用机制,从血管生成角度探索膀胱癌的发生发展。

1 材料与方法

1.1 材料 膀胱癌 BIU87 细胞(南京凯基生物有限公司);RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);脂质体 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司);Endothelial Tube Formation Assay(体外血管,美国 Cell Biolabs 公司)、基质胶(美国 BD 公司);兔抗人磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)、磷酸化 AKT(p-AKT)、磷酸化 PTEN(p-PTEN)、糖原合成酶(GSK3)、磷酸化 GSK3(p-GSK3)及二抗(美国 Immunoway 公司);ANG 单克隆抗体(美国 Abcam 公司);核糖核酸酶抑制因子(RI)多克隆抗体(重庆医科大学细胞生物学与遗传学教研室保存);G418(中国碧云天生物技术有限公司);Dual-Glo[®] Luciferase Assay 试剂盒和 PRL-TK 质粒(美国 Promega 公司);白皮受精鸡蛋(重庆市种禽育种公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 构建突变体质粒

1.2.1.1 pCMV-3 × flag-ANG^{H13R} 和 pCMV-3 × flag-ANG^{H14R} 突变体合成 pCMV-3 × flag-ANG^{H13R} 引物:上游引物为 5'-CACACTTCCTGAC-CCAGCGCTATGATGCCAAACCACAG-3',下游引物为 5'-CTGTGGTTTGGCATCATAGCGCTGGGT CAGGAAGTGTG-3';pCMV-3 × flag-ANG^{H14R} 引物:上游引物为 5'-GAAAATGGCTTACCTGTCCGCT-TGGATCAGTCAATTTTC-3',下游引物为 5'-GAAAATTGACTGATCCAAGCGGACAGGTAAG CCATTTTTC-3'。

1.2.1.2 突变反应体系 模板 DNA 2.5 μL,突变体引物 2.0 μL,dNTPs 4.0 μL,Pyrobest 聚合酶 0.4 μL,pyrobest buffer 5.0 μL,ddH₂O 36 μL,总体积 50 μL。突变条件:94 ℃,30 s;68 ℃,30 s;72 ℃,10 min;12 个循环。1%琼脂糖凝胶电泳鉴定突变产物。

1.2.1.3 质粒转化 感受态菌中加入突变反应产物,4 ℃静置 30 min。42 ℃孵育 2 min,4 ℃刺激 2 min。加入 900 μL LB 培养基(不含抗菌药物)混匀,37 ℃恒温摇床振荡培养 1 h。取 100 μL 转化后的混合液接种到 LB 平板培养皿中(含抗菌药物)。37 ℃孵箱中正放培养 30 min 后,倒置培养 18 h。挑选单

克隆接种于 LB 培养基中(含抗菌药物),37 ℃,300 r/min 振荡培养 18 h。

1.2.1.4 pCMV-3 × flag-ANG^{H13R} 和 pCMV-3 × flag-ANG^{H14R} 酶切体系 Hind III 2.5 μL,BamH I 2.5 μL,10 × K Buffer 5 μL,pCMV-3 × flag-ANG 突变体质粒 25 μL,ddH₂O 15 μL,总体积 50 μL。37 ℃恒温金属浴反应 5 h,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,并送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 建立稳定转染细胞系 实验组(pEGFP-C1-ANG^{H13R}、pEGFP-C1-ANG^{H14R}、pEGFP-C1-ANG)和对照组(pEGFP-C1)质粒分别用脂质体 Lipofectamine 2000 转染 BIU87 细胞。24 h 后移植到 6 孔板,细胞培养箱中继续培养,48 h 后换 10%血清培养基(含 600 μg/mL G418)培养。两周后 G418 浓度减半,用 300 μg/mL G418 继续培养两周,最后将幸存下来的细胞转移到 96 孔板中扩大培养,稳定转染细胞系构建成功。

1.2.3 蛋白质印迹法(Western blot)检测 PI3K/AKT/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路靶蛋白 提取细胞总蛋白,使用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度。非磷酸化蛋白 AKT、PI3K、PTEN、GSK3(α/β)、mTOR 和磷酸化蛋白 p-GSK3(α/β)、p-AKT、p-PTEN、p-PI3K、p-mTOR 抗体稀释比例均为 1:500。

1.2.4 鸡胚尿囊绒毛膜(CAM)血管生成实验 白皮受精鸡蛋清洗消毒,分为实验组和对照组,每组随机 10 只鸡蛋。37.5 ℃、湿度 60%,孵育 5 d,75%乙醇消毒气室端蛋壳,用尖嘴镊形成 0.5 cm × 0.5 cm 小孔,形成假气室。75%乙醇消毒,滴 2~3 滴生理盐水将气室膜和 CAM 分离开,去除气室膜,暴露 CAM。用基质胶将各组细胞制成悬液,分别加入 CAM,命名为实验组(BIU87-ANG^{H14R}、BIU87-ANG^{H13R}、BIU87-ANG)和对照组(BIU87-C1)。继续孵育 72 h。小孔中加入甲醇和丙醇等体积混合液 3 mL,室温固定 15 min,将固定后的 CAM 剪下,风干并拍照。

1.2.5 小管形成实验 取预冷的 96 孔板,每孔加入解冻的 ECM 胶 50 μL,37 ℃孵育 30 min,使 ECM 溶液形成凝胶。每孔加入 150 μL 细胞悬浮液(1.5~3.0) × 10⁴ 个/毫升到固化的 ECM 凝胶上,37 ℃孵育 10 h。高倍视野下用光学显微镜检查内皮管。

1.2.6 过表达 RI 对 ANG 及其突变体促核糖体 RNA(rRNA)转录活性的影响

1.2.6.1 构建荧光素酶报告基因载体 以基因组 DNA 为模板,扩增 rRNA 启动子序列,上游引物:5'-CGGGGTACCGCGGTCCCTCTGCCGCGA-3';下游引物:5'-CCCAAGCTTAGCGCGACCTCTCGGGC C-3'。PCR 条件:94 ℃,2 min;94 ℃,30 s,63 ℃,30 s,72 ℃,100 s,30 个循环;72 ℃延伸 5 min。Kpn I 和 Hind III 双酶切鉴定。

1.2.6.2 双荧光素酶报告基因系统检测 rRNA 转录活性 96 孔板中加入与孔中培养基相等体积的 Dual-Glo[®] 试剂,等待 10 min,在发光仪中测量萤火虫荧光

素酶的发光;向每个孔中加入与原培养基体积相等的 Dual-Glo® Stop&Glo® 试剂并混合,等待 10 min,然后检测海肾荧光素酶发光;海肾荧光素酶发光应按与萤火虫荧光素酶发光相同的板序读取。计算实验报告发光与对照报告发光的比值。

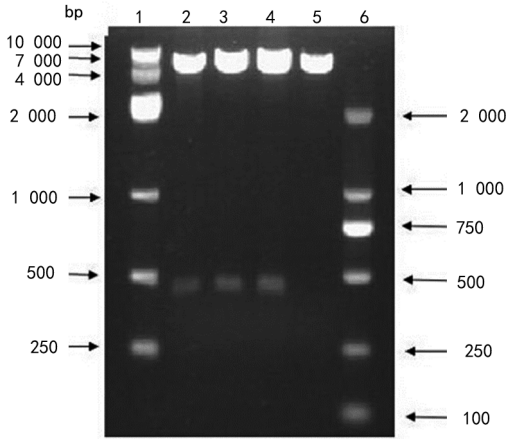
1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据处理和分析。多组间比较采用方差分析,组内比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ANG 突变质粒(pCMV-3×flag-ANG^{H13R}、pCMV-3×flag-ANG^{H14R})构建成功 琼脂糖凝胶电泳结果显示,pCMV-3×flag 质粒大小约为 6 400 bp,ANG 突变体大小约为 500 bp,与 PCR 结果吻合(图 1)。测序结果分析也表明,在特定位置发生突变,突变体构建成功(图 2)。

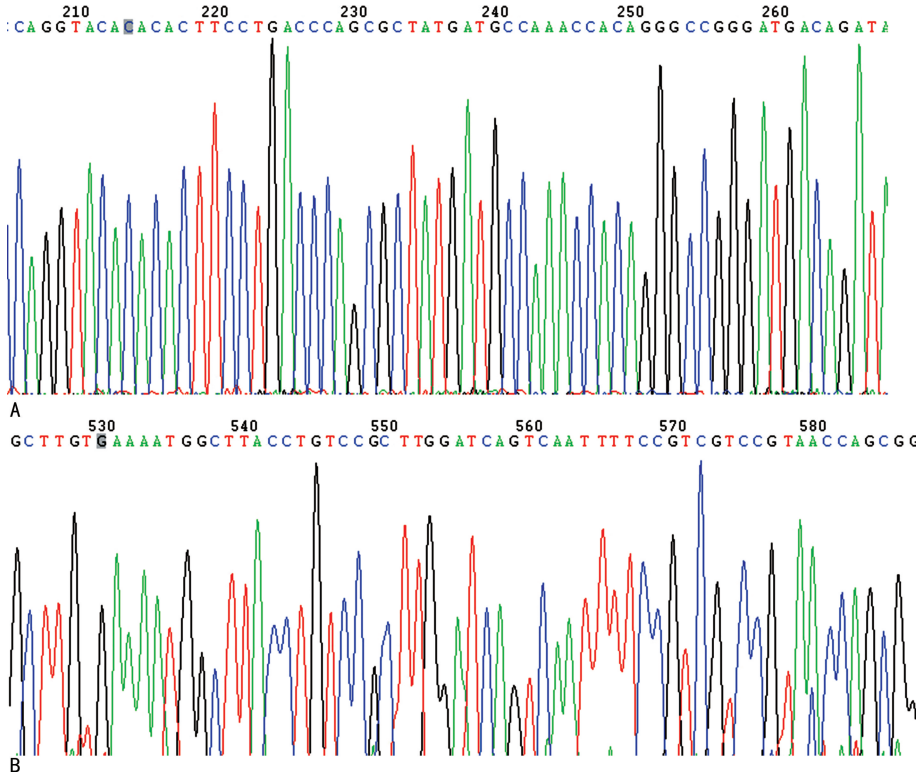
2.2 稳定转染 ANG 及其突变体的膀胱癌 BIU87 细胞系构建成功 各组稳定转染细胞系都属于 pEGFP-C1 系列带有绿色荧光,可直接用荧光显微镜观察细

胞系表达情况,表明各组稳定转染细胞系构建成功。见图 3。



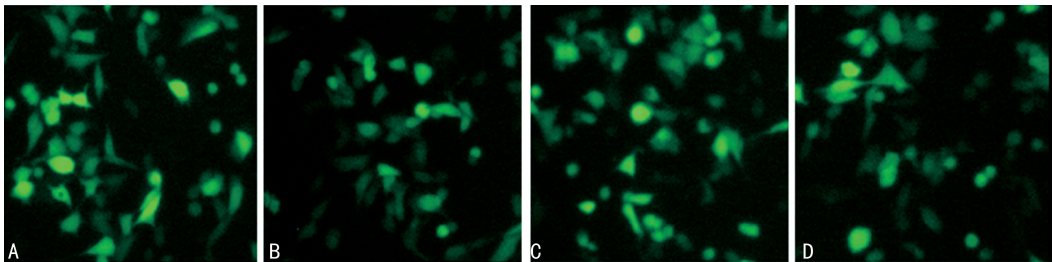
注:1 为 Marker;2 为 pCMV-3×flag-ANG^{H13R};3 为 pCMV-3×flag-ANG^{H14R};4 为 pCMV-3×flag-ANG;5 为 pCMV-3×flag;6 为 Marker。

图 1 pCMV-3×flag-ANG^{H13R}、pCMV-3×flag-ANG^{H14R} 突变体质粒的酶切鉴定



注:A 为 pCMV-3×flag-ANG^{H13R} 测序鉴定图;B 为 pCMV-3×flag-ANG^{H14R} 测序鉴定图。

图 2 pCMV-3×flag-ANG^{H13R}、pCMV-3×flag-ANG^{H14R} 测序鉴定



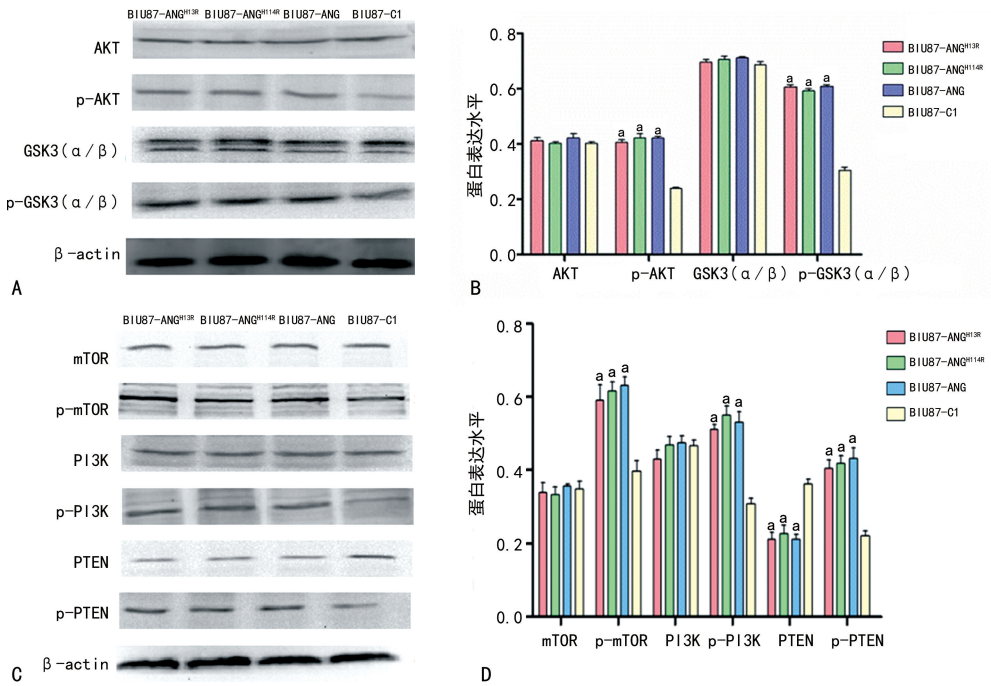
注:A 为 BIU87-ANG^{H13R};B 为 BIU87-ANG^{H14R};C 为 BIU87-ANG;D 为 BIU87-C1。

图 3 稳定转染 ANG 及其突变体的膀胱癌 BIU87 细胞系

2.3 Western blot 检测信号通路中的靶蛋白 结果显示,与对照组比较,实验组 p-PI3K、p-AKT、p-GSK3 (α/β)、p-mTOR、p-PTEN 的表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 4。

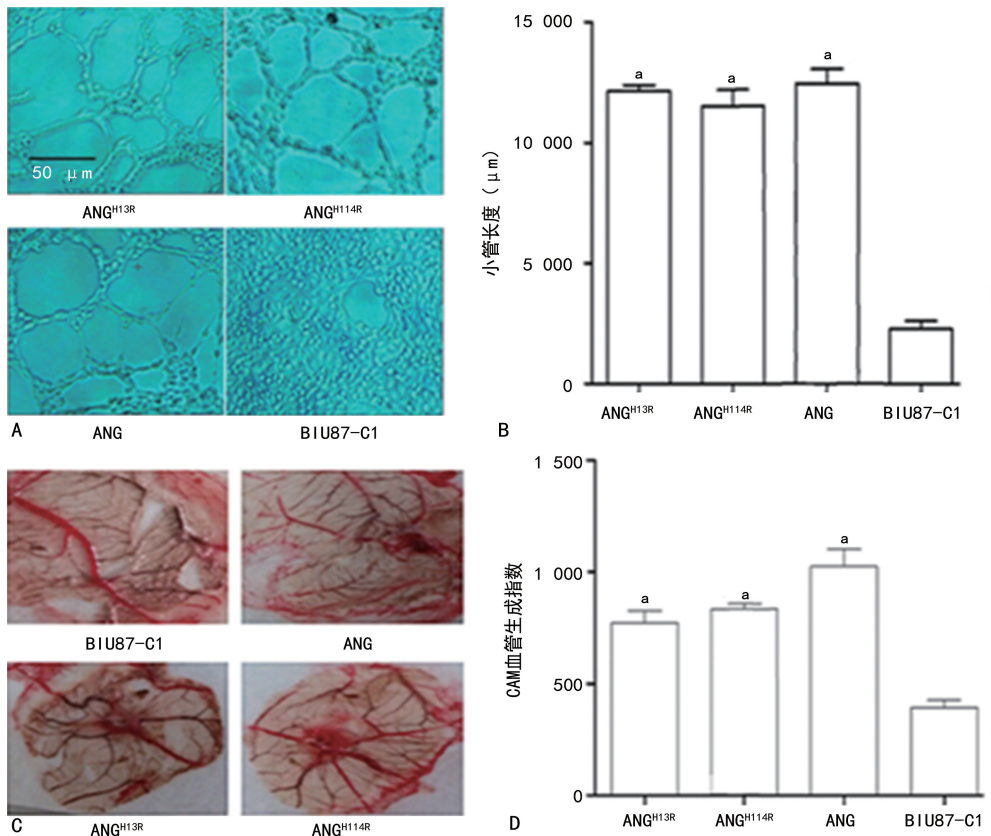
2.4 ANG 及其突变体促进 CAM 血管生成和小管形

成 CAM 血管生成实验和小管形成实验结果均显示,实验组 (BIU87-ANG^{H13R}、BIU87-ANG^{H114R}、BIU87-ANG)CAM 血管生成及小管形成均明显多于对照组 (BIU87-C1),表明实验组 ANG 及其突变体可促进肿瘤血管生成。见图 5。



注:A、C为各蛋白的 Western blot 结果;B、D为各蛋白的统计分析结果;与 BIU87-C1 比较,^a $P<0.05$ 。

图 4 过表达 RI 调控 ANG 促 PI3K/AKT/mTOR 信号通路磷酸化水平

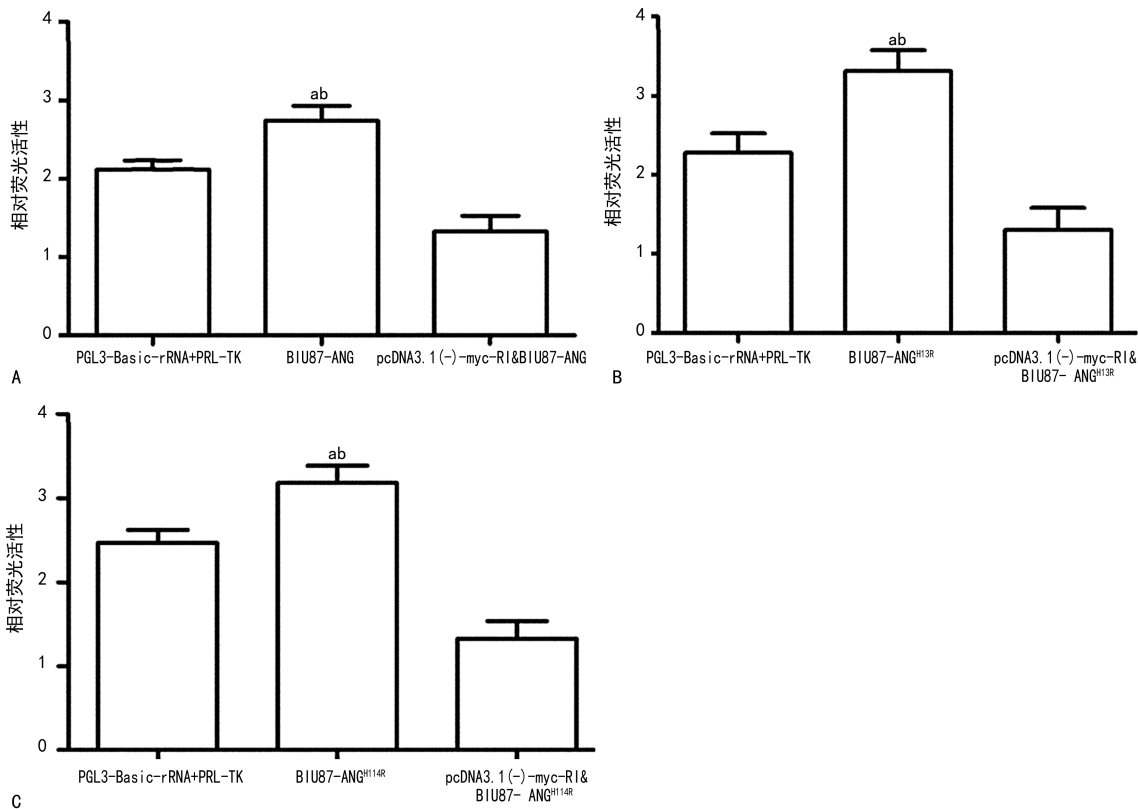


注:A为实验组和对照组小管形成实验结果;B为实验组和对照组小管形成实验统计分析结果;C为实验组和对照组 CAM 血管形成实验结果;D为实验组和对照组 CAM 血管形成实验统计分析结果;与 BIU87-C1 比较,^a $P<0.05$ 。

图 5 ANG 及其突变体对膀胱癌肿瘤小管形成及 CAM 血管生成的影响

2.5 RI 抑制 ANG 及其突变体促核糖体 RNA 的转录活性 运用双荧光素酶报告基因检测系统对 rRNA 转录活性检测结果表明,RI 抑制 ANG 及其突

变体促核糖体 RNA 的转录活性,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 6。



注:A 为 BIU87-ANG 组双荧光素酶相对荧光活性;B 为 BIU87-ANG^{H13R} 组双荧光素酶相对荧光活性;C 为 BIU87-ANG^{H114R} 组双荧光素酶相对荧光活性;与 PGL3-Basic-rRNA+PRL-TK 比较,^a $P<0.05$;与 pcDNA3.1(-)-myc-R1&BIU87-ANG 比较,^b $P<0.05$ 。

图 6 RI 抑制 ANG 及其突变体促核糖体 RNA 的转录活性

3 讨论

ANG 是一种重要的促进血管生成的作用因子,在淋巴管和血管生长成熟中起关键作用,由纤维蛋白原样结构、蛋白信号肽、螺旋结构域三部分组成。目前发现 4 个亚型^[9],分别是 ANG-1、ANG-2、ANG-3、ANG-4。ANG-1 是 Tie2 的激动剂,与 Tie2 结合后能激活并诱导其磷酸化,促进血管的内皮细胞形成管状结构,增加结构稳定性;吸引血管周围细胞支持,包围内皮细胞,促进血管重新塑造,以维持血管完整性^[10]。ANG-2 约有 60% 与 ANG-1 相同,机体胚胎发育时其主要在肝血管壁和大血管平滑肌中表达,而处于成体时其主要在胎盘、子宫和卵巢中表达,通过抑制 ANG-1 活化的程度,开始调节内分泌环路,维持血管的生长及退化的动态平衡,在缺氧情况下可促进其表达^[11]。目前,关于 ANG-3、ANG-4 的研究较少。在 ANG 的 123 个残基蛋白质中包含许多重要的生物活性位点,比如核转位序列、核受体结合位点、RNase 活性中心等,此类位点可能与 ANG 的未知生物功能相关^[12]。本研究针对核转位序列将 ANG 基因 13 位和 114 位的氨基酸由组氨酸突变为精氨酸,目的是初步探索 ANG 的生物特性,为进一步了解 ANG 促进

膀胱癌肿瘤血管生成和肿瘤细胞增殖的研究做准备。研究表明,血管生成及新血管的形成对实体瘤的生长转移起非常重要的作用,新生成的血管可为实体瘤的生长和转移提供丰富的氧气和营养物质,为肿瘤细胞的转移和免疫细胞的渗透提供通道,并且能带走肿瘤细胞产生的废物^[13]。在没有新生血管形成时,实体肿瘤长到 1~2 mm³ 时,肿瘤减小消退,甚至消失。在肿瘤的早期阶段,新生血管形成较少且缓慢,肿瘤处于休眠状态,当促血管生成因子占据优势时血管形成活跃,诱导新生血管形成,是肿瘤血管化的启动标志^[14]。外源性试验抑制血管的生成可以明显地抑制肿瘤的生长,甚至可以使肿瘤消退,所以新生血管对于肿瘤的生长和转移发挥巨大作用。所有的实体肿瘤生长和转移都依赖于新生血管的形成,这个特征为实体肿瘤的诊断和治疗提供了一个新的方向。本研究构建了 pCMV-3×flag-ANG^{H13R}、pCMV-3×flag-ANG^{H114R} 两个突变体质粒用于初步探索 ANG 的生物学功能,研究结果表明,ANG 及上述两个突变体能促进小管的形成,在 CAM 血管形成实验中促进血管生成,实验组 (BIU87-ANG^{H13R}、BIU87-ANG^{H114R}、BIU87-ANG)CAM 血管生成及小管形成

均明显多于对照组(BIU87-C1),表明 ANG 及其突变体可促进肿瘤血管生成。相关报道表明,ANG 可通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路刺激 rRNA 转录和核糖体生物合成,其双重作用为肿瘤的治疗提供了方向^[15]。PI3K/AKT/mTOR 是一个经典的信号通路,影响细胞凋亡和肿瘤细胞生存,调节细胞增殖及分化^[16]。ANG 和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中的 AKT 交互应答,ANG 激活 AKT,激活的 AKT 促进 ANG 的核转位^[16]。mTOR 作为 PI3K/AKT/mTOR 信号通路下游的一个效应器,AKT 能直接激活 mTOR 的磷酸化反应。ANG 诱导 AKT 的磷酸化,可促进伤口愈合和 CAM 血管的生成。ANG 不仅能促进 PI3K/AKT 磷酸化并激活 AKT 传导通路,还能使 GSK-3 β 、mTOR 蛋白磷酸化,磷酸化可抑制其生物学作用。ANG 可通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路参与肿瘤血管的发生发展。前期研究证实,RI 与 ANG 相互作用抑制 BALB/C 裸鼠人膀胱癌移植瘤的生长转移,同时抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中磷酸化蛋白的水平^[17]。也有研究显示,Ang/Tie2 信号通路^[18]、黑色素瘤^[19]、乳腺癌^[20]等肿瘤的发生发展存在密切联系,这也为下一步研究拓展了方向。

本研究寻找到 ANG 中 H13R 和 H114R 两个可能的突变位点,它们通过 PI3K/AKT/mTOR 通路影响其促血管生成特性,为探索 ANG 在膀胱癌中的分子机制提供理论依据。目前研究结果表明,本研究 ANG 突变体基本达到预期的效果,笔者将在后续实验中继续探索 ANG 的生物学功能。

参考文献

[1] 易善红. 我国膀胱癌诊治指南解读[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版),2013,7(3):924-925.

[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.

[3] ACHARYA K R, SHAPIRO R, ALLEN S C, et al. Crystal structure of human angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(8):2915-2918.

[4] 钱程, 郑维维, 邹伟, 等. Ang/Tie 轴对肿瘤血管生成和转移作用的研究进展[J]. 药学报, 2020, 55(10):63-69.

[5] FUKUMURA D, KLOPPER J, AMOOZGAR Z, et al. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: Opportunities and challenges[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(5):325-340.

[6] RAHMA O E, HODI F S. The intersection between tumor

angiogenesis and immune suppression[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(18):5449-5457.

[7] BOSISIO D, RONCA R, SALVI V, et al. Dendritic cells in inflammatory angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. Curr Opin Immunol, 2018, 53:180-186.

[8] JÁSZAI J, SCHMIDT M H H. Trends and challenges in tumor anti-angiogenic therapies[J]. Cells, 2019, 8(9):1102.

[9] FAGIANI E, CHRISTOFORI G. Angiopoietins in angiogenesis[J]. Cancer Lett, 2013, 328(1):18-26.

[10] GILLEN J, RICHARDSON D, MOORE K. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 inhibitors: Clinical development[J]. Curr Oncol Rep, 2019, 21(3):22.

[11] AKWII R G, SAJIB M S, ZAHRA F T, et al. Role of angiopoietin-2 in vascular physiology and pathophysiology[J]. Cells, 2019, 8(5):471.

[12] LI S P, IBARAGI S, HU G F, et al. Angiogenin as a molecular target for the treatment of prostate cancer[J]. Curr Cancer Ther Rev, 2011, 7(2):83-90.

[13] VIALARD C, LARRIVÉE B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets[J]. Angiogenesis, 2017, 20(4):409-426.

[14] LUGANO R, RAMACHANDRAN M, DIMBERG A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(9):1745-1770.

[15] LOPES-COELHO F, MARTINS F, PEREIRA S A, et al. Anti-angiogenic therapy: current challenges and future perspectives[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7):3765.

[16] WANG S S, CHEN Y H, CHEN N, et al. Hydrogen sulfide promotes autophagy of hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3):e2688.

[17] 刘玉林, 黄晓楠, 赵琪林, 等. RI 与 ANG 相互作用对 BALB/C 裸鼠人膀胱癌移植瘤生长转移及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(4):34-38.

[18] MUNAKATA S, UHEYAMA T, ISHIHARA H, et al. Angiopoietin-2 as a prognostic factor in patients with incurable stage IV colorectal cancer[J]. J Gastrointest Cancer, 2021, 52(1):237-242.

[19] ABDUL PARI A A, SINGHAL M, HÜBERS C, et al. Tumor cell-derived angiopoietin-2 promotes metastasis in melanoma[J]. Cancer Res, 2020, 80(12):2586-2598.

[20] SONG Q Z, ZHANG F L, YUAN T, et al. Upregulated Tie2 expression in plasma: a potential non-invasive biomarker for the diagnosis of breast cancer[J]. Eur Cytokine Netw, 2021, 32(2):39-47.