

• 药理与临床 •

薏苡仁油对人原位胰腺癌 BxPC-3 细胞生长及 VEGF 和 bFGF 表达的影响

许 健¹, 沈 雯¹, 孙金权¹, 吴晓莉¹, 牟一平², 李 毅^{1*}

1. 浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江大学附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310029

摘要: 目的 研究薏苡仁油(康莱特注射液)体外对人原位胰腺癌 BxPC-3 细胞生长和血管生长因子的影响, 探讨薏苡仁油抗肿瘤作用机制。方法 薏苡仁油作用 BxPC-3 细胞后, 经瑞氏染色观察细胞形态, Hoechst 33258 荧光染色、DNA 梯度电泳观察细胞凋亡; 流式细胞仪检测细胞周期的变化; ELISA 法检测血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(bFGF)的变化。结果 薏苡仁油(2 mg/mL, 20 μL/mL)作用于 BxPC-3 细胞后, 瑞氏染色可见细胞出现典型的凋亡小体, Hoechst 33258 荧光染色可见 BxPC-3 细胞出现特征性凋亡变化, 琼脂糖电泳观察到明显的细胞凋亡特征性 DNA 梯形条带; 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期; 细胞上清液中 VEGF、bFGF 的表达水平明显下调。结论 薏苡仁油能影响 BxPC-3 细胞生长周期, 导致细胞周期阻滞, 下调 VEGF 和 bFGF 的表达水平, 可能对抑制胰腺癌细胞的扩散产生一定作用。

关键词: 薏苡仁油; 人原位胰腺癌 BxPC-3 细胞; 细胞周期; 血管内皮生长因子(VEGF); 成纤维细胞生长因子(bFGF)

中图分类号: R285.5; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0724-05

Effects of *Coicis Semen* oil on growth of human *in situ* pancreatic cancer cell line BxPC-3 and expression of VEGF and bFGF

XU Jian¹, SHEN Wen¹, SUN Jin-quan¹, WU Xiao-li¹, MU Yi-ping², LI Yi¹

1. College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *Coicis Semen* oil (Kanglaite Injection) on the proliferation, apoptosis, and vascular endothelial growth factor (VEGF) of human *in situ* pancreatic cancer cell line BxPC-3 *in vitro*, and to explore its mechanism.

Methods BxPC-3 cells *in vitro* were treated with *Coicis Semen* oil (2 mg/mL, 20 μL/mL), cell morphology was observed by Wright's staining; Apoptosis was assayed by Hoechst 33258 fluorescence staining and DNA gradient agarose gel electrophoresis; Diversification of cell cycle was detected by flow cytometry; Changes of VEGF and fibroblast growth factor (bFGF) were detected by ELISA. **Results** Wright's staining showed characteristic apoptotic body in BxPC-3 cells; Hoechst 33258 fluorescence staining showed characteristic change of apoptosis; Obvious DNA-ladder strap was observed by agarose gel electrophoresis; Cell cycle was retarded on G₀/G₁ stages; The level of VEGF and bFGF expression in the cell liquid supernatant has been a distinct decline.

Conclusion *Coicis Semen* oil could affect the cell growth cycle of BxPC-3 cells, conduce the retardance of cell cycle, and reduce the level of VEGF and bFGF expression, which may help for restraining the pervasion of pancreatic cancer cells to some extent.

Key words: *Coicis Semen* oil; human *in situ* pancreatic cancer cell line BxPC-3; cell cycle; vascular endothelial growth factor (VEGF); fibroblast growth factor (bFGF)

近些年,胰腺肿瘤的发病率及病死率逐年上升, 6个月左右,被称为“癌中之王”,这些情况均与其病程短、死亡率高、恶性程度高,中位生存期仅起病隐袭、早诊率低、诊断明确后缺乏有效治疗手

收稿日期: 2011-11-01

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y2080506); 浙江省教育厅重点项目(Z200908281); 浙江省中医药管理局资助项目(2010ZB026); 浙江省大学生创新创业孵化项目(2010R410059)

作者简介: 许 健(1968—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中医药抗肿瘤及其临床免疫学检验。

Tel: (0571)86633001 E-mail: xujian832002@163.com

*通讯作者 李 毅 Tel: 18957130281 E-mail: liyitem@163.com; shenwen001270@163.com

段有关。2007 年美国癌症统计数据显示^[1], 胰腺癌高居癌症死亡原因的第 4 位, 5 年生存率仅为 1%~3%。胰腺肿瘤起病隐袭主要归因于胰腺导管上皮在病理发展上具有早期侵犯血管与淋巴结的特征^[2], 胰腺肿瘤组织分型也以导管细胞癌多见, 约占 90%。血管形成与肿瘤的持续生长和转移关系密切, 当肿瘤发展到一定阶段, 直径>2 mm 时, 需要新生血管来提供营养和氧气, 以维持其不断发展的生物学进程。

薏苡仁为禾本科多年生草本植物薏苡 *Coix lacryma-jobi* L. var. *mayuen* (Roman.) Stapf 的成熟种仁; 性凉, 味甘、淡^[3]。从 20 世纪 60 年代开始陆续报道薏苡仁有抗肿瘤、免疫调节、降血糖血钙、降血压、调脂减肥、抗疟原虫、抗病毒、抑制胰蛋白酶、诱发排卵等多方面药理活性^[4], 其中以薏苡仁的抗肿瘤作用研究最为深入^[5-6]。李青山等^[7]研究显示, 薏苡仁注射液联合低剂量顺铂和 5-氟尿嘧啶治疗晚期胰腺癌, 能提高病情缓解率和临床受益反应率, 不良反应能耐受。薏苡仁还能抑制体外培养的人原位胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖, 以 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的作用最佳, 其有效作用最佳时间段可能在 36 h 内^[8]。本实验通过观察薏苡仁油体外对 BxPC-3 细胞增殖、凋亡及对血管生长因子的影响, 探讨其对 BxPC-3 细胞可能的作用机制, 为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

薏苡仁油, 即康莱特注射液, 规格 100 mL/瓶, 10 g, 杭州华东医药公司, 批号 200905221-2。RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶, 浙江杭州吉诺生物医药技术有限公司; 无支原体胎牛血清, 浙江天杭生物科技有限公司; 瑞氏染色液, 上海索莱宝生物科技有限公司; 细胞凋亡 Hoechst 33258 荧光检测试剂盒, 南京凯基生物科技发展有限公司; 琼脂糖, 西班牙 Biowest 公司; PI 试剂, Ben-der MedSystems 公司; 血管内皮生长因子 (VEGF) ELISA 提取试剂盒, 深圳依诺金生物科技有限公司; 成纤维细胞生长因子 (bFGF) ELISA 提取试剂盒, 武汉华美生物工程有限公司; 细胞/组织基因 DNA 提取试剂盒 (离心柱型), 上海捷瑞生物有限公司。

1.2 仪器

Bedford 流式细胞仪, 美国 Becton-Dickinson 公司; Costar 3516 型 6 孔细胞培养板, 美国 Corning 公司; Biofuge(r)Pico 台式离心机, 德国 Heraeus 公司; Hepa Class 100 3111 型二氧化碳培养箱, 美国

Thermo 公司; CKX31 型倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; Model 680 型全自动酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; 微量移液枪, 德国 Eppendorf 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

BxPC-3 细胞购自中国科学院上海细胞研究所。将 BxPC-3 细胞 (贴壁生长) 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中进行适应性培养, 次日细胞换液或传代, 细胞仍按常规条件进行培养 (RPMI 1640 培养液, 含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素), 取对数生长期细胞进行相关实验。

2.2 细胞形态学观察

2.2.1 瑞氏染色 取对数生长期细胞, 以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 密度接种于 25 mL 的培养瓶中。设对照组与给药组, 对照组为不加药物的细胞, 给药组加入薏苡仁油 2 mg/mL (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 作用于 BxPC-3 细胞 24 h, 细胞消化、离心, 收集细胞, 涂片进行瑞氏染色, 油镜下 ($\times 100$) 观察细胞形态变化。

2.2.2 Hoechst 33258 荧光染色 按“2.2.1”项下方法处理细胞, 以细胞凋亡荧光 Hoechst 33258 检测试剂盒操作流程进行操作, 最后以 340 nm 波长紫外光激发, 荧光显微镜下 ($\times 200$) 观察荧光强弱。

2.3 琼脂糖凝胶电泳观察细胞 DNA 变化

按“2.2.1”项下方法处理细胞, 用细胞/组织基因 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 提取 DNA, 进行 1%琼脂糖凝胶电泳 45 min 后, 利用 BIO-RAD 电子凝胶成像系统进行凝胶拍照, 记录电泳结果。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期

取对数生长期细胞, 以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔板中。细胞分为对照组、薏苡仁油 (2.0、1.0、0.5 mg/mL) 组, 每组设 3 个复孔。加药培养 24 h 后, 细胞消化、离心, 收集细胞沉淀, 用冷 PBS 重悬细胞并加入到流式管冰乙醇中, 使乙醇的终体积分数达到 70%, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定过夜后, 1 200 r/min 离心 5 min 弃去上清, 用 PBS 重悬细胞得单细胞悬液。向细胞悬液中加入等体积含有 RNase 的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI 溶液, 室温避光染色 20 min, 流式细胞仪检测各组 PI 荧光强度, 激发波长 488 nm, 接收通道 FL2 (长通滤片 > 580 nm)。每孔测定细胞数量 10 000 个, 每组样品重复 3 次。数据采用流式细胞仪 Cellquesttm 软件进行分析。

2.5 ELISA 法检测 bFGF 和 VEGF 表达

按“2.4”项下方法处理细胞和分组, 加药分别

培养 24、48、72 h 后,取细胞上清液,分别用 bFGF 和 VEGF ELISA 提取试剂盒检测 bFGF 和 VEGF,最终用全自动酶标仪在 450 nm 处检测各孔的吸光度(A)值。

2.6 统计分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 17.0 软件进行方差分析及组间比较。

3 结果

3.1 对 BxPC-3 细胞凋亡的影响

3.1.1 细胞形态学观察 倒置显微镜观察可见(瑞氏染色),对照组细胞体积大,核仁较大,核质比大,胞膜与核膜清晰光滑完整;薏苡仁 2 mg/mL 作用细胞 24 h 后,胞浆中可见游离的凋亡小体,细胞核固缩、碎裂,细胞核染色质聚积于核周,贴近核膜。荧光显微镜观察可见(Hoechst 33258 荧光染色)对照组细胞呈均匀微弱的荧光,经薏苡仁 2 mg/mL 作用 24 h 后,细胞膜与细胞核呈浓缩致密的强蓝色荧光。结果见图 1。

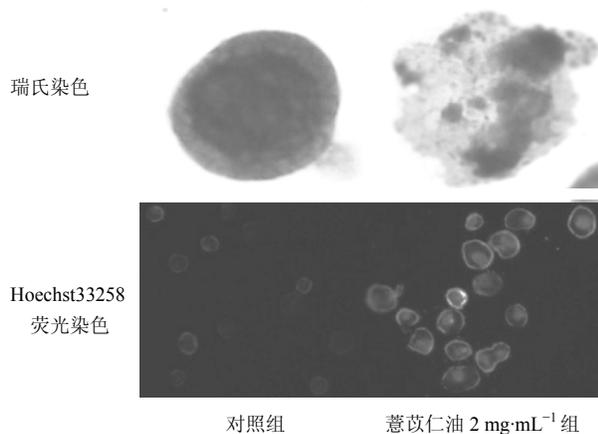
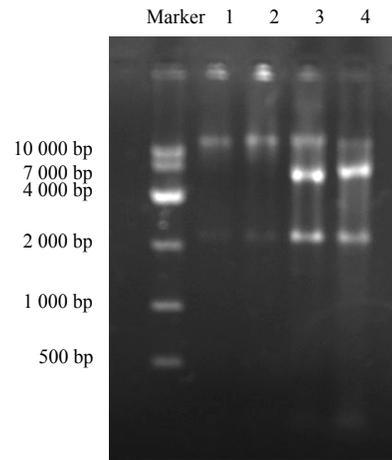


图 1 薏苡仁油对 BxPC-3 细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effects of *Coicis Semen* oil on BxPC-3 cell apoptosis

3.1.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果 薏苡仁 2 mg/mL 作用于 BxPC-3 细胞 24 h 后,经 DNA 琼脂糖凝胶电泳,可见具有凋亡特征性的梯形条带,而对照组无梯状条带。结果见图 2。



1、2-对照组 3、4-薏苡仁油 20 μL·mL⁻¹ 组
1, 2-control group 3, 4-*Coicis Semen* oil 20 μL·mL⁻¹ group

图 2 BxPC-3 细胞凋亡 DNA 凝胶电泳图

Fig. 2 DNA gel electrophoresis of BxPC-3 cell apoptosis

3.2 对 BxPC-3 细胞周期的影响

与对照组比较,薏苡仁油 0.5 mg/mL 组细胞 G₀/G₁ 期比例无显著变化 ($P > 0.05$);薏苡仁油 1.0、2.0 mg/mL 组细胞 G₀/G₁ 期比例显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01),表明薏苡仁油 1.0、2.0 mg/mL 可将细胞阻滞于 G₀/G₁ 期。结果见表 1。

3.3 对 BxPC-3 细胞 bFGF 和 VEGF 表达的影响

BxPC-3 细胞经不同质量浓度的薏苡仁油作用 24、48、72 h 后,bFGF 的表达水平明显低于对照组,在 3 个时间点的表达量与对照组相比差异显著

表 1 薏苡仁油对 BxPC-3 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of *Coicis Semen* oil on cell cycle of BxPC-3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | $\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ | 细胞周期分布 / % | | |
|------|---|--------------------------------|--------------|-------------------|
| | | G ₀ /G ₁ | S | G ₂ /M |
| 对照 | — | 73.64 ± 2.63 | 14.15 ± 2.99 | 12.20 ± 1.42 |
| 薏苡仁油 | 0.5 | 77.36 ± 0.40 | 12.98 ± 0.82 | 9.67 ± 0.50 |
| | 1.0 | 78.88 ± 0.29* | 11.68 ± 0.30 | 9.44 ± 0.50 |
| | 2.0 | 81.63 ± 0.27** | 12.08 ± 0.72 | 6.29 ± 0.46** |

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 尤其在 48 h 时与对照组比较差异极显著($P < 0.001$), 仅低质量浓度(0.5 mg/mL) 组在 72 h 时的表达量与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。同一时间段内 4 个组比较结果显示, 所有薏苡仁给药组的 bFGF 表达量均低于对照组, 薏苡仁油高质量浓度 (2.0 mg/mL) 组 bFGF 表达量最低, 结果见表 2。

BxPC-3 细胞经不同质量浓度的薏苡仁油作用 24、48、72 h 后, VEGF 的表达水平明显低于对照组, 在 3 个时间点的表达量与对照组相比差异显著($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 在 24、48 h 的表达量与在 72 h 时相比差异显著 ($P < 0.001$)。同一时间段内, 薏苡仁油 3 个给药组 VEGF 的表达量均低于对照组, 且在各个时间点的差异不大。结果见表 2。

表 2 薏苡仁油对 BxPC-3 细胞 bFGF 和 VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effects of *Coicis Semen* oil on bFGF and VEGF expression in BxPC-3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | $\rho / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ | bFGF / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) | | | VEGF / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) | | |
|------|---|---|------------------|------------------|---|------------------|-----------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| 对照 | — | 2.731 ± 0.430 | 3.877 ± 0.160 | 4.840 ± 0.196 | 2.201 ± 0.075 | 3.090 ± 0.163 | 3.498 ± 0.047 |
| 薏苡仁油 | 0.5 | 2.071 ± 0.086* | 2.314 ± 0.111*** | 2.931 ± 0.049 | 1.993 ± 0.043* | 1.209 ± 0.098*** | 2.518 ± 0.083** |
| | 1.0 | 1.698 ± 0.049** | 1.681 ± 0.270*** | 2.436 ± 0.651** | 1.201 ± 0.010*** | 0.978 ± 0.067*** | 2.894 ± 0.134* |
| | 2.0 | 1.325 ± 0.037** | 1.307 ± 0.061*** | 1.924 ± 0.061*** | 1.181 ± 0.054*** | 1.083 ± 0.049*** | 2.723 ± 0.088* |

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

4 讨论

薏苡仁, 又名薏仁、苡仁、米仁、薏米、六谷米、菩提珠等, 既是常用的利水渗湿中药, 又是人们生活中喜爱的食品。薏苡仁可治肺水肿、湿性肋膜炎、排尿障碍、慢性胃肠病、慢性溃疡等疾病, 也是极具应用前景的抗肿瘤药物。近年来应用现代生物和化学等技术研究薏苡仁药物的成果颇丰, 除传统的单、复方的药理研究外, 薏苡仁提取物的基础研究和临床研究也不断有新的发现^[9]。

本实验中使用的薏苡仁油 (康莱特注射液) 从薏苡仁中提取得到的脂肪油, 对中晚期肿瘤患者具有一定的抗恶病质和镇痛作用。袁耀宗等^[10]采用 Anxiny/PI 双染色法进行研究发现, 康莱特注射液具有诱导人胰腺癌 Patu-8988 细胞凋亡的作用; 进一步应用基因芯片技术、Western blotting 等方法检测证明胰腺癌细胞经康莱特注射液作用后, 96 条有关细胞凋亡的目的条带中有 17 条表达发生大于 3 倍的显著变化 (上调有 12 条, 下调有 5 条), 其中 p53、Bcl-2 等蛋白表达改变与芯片结果一致, 同时 Caspase-3 底物多聚 ADP 核糖多聚酶也被降解。鲍英等^[11]同时应用 TUNEL 染色法、DNA 梯度电泳及流式细胞术 3 种方法检测康莱特注射液对胰腺癌 8988 细胞凋亡的影响, 发现康莱特注射液能诱导人胰腺癌细胞凋亡; 进一步应用 RT-PCR 和 Western blotting 技术检测发现 p53 基因表达显著增加, 而

Bcl-2 基因表达减少。Seo 等^[12]应用免疫组化方法检测 142 例胰腺癌患者术后标本 VEGF 和微血管密度 (MVD) 表达情况, 结果显示 VEGF 阳性率达 93% (132/142), VEGF 和 MVD 有显著相关性; 多因素分析发现 VEGF 高表达与胰腺癌肝转移密切相关。王伟等^[13]通过建立人胰腺癌 PC-3 细胞裸鼠皮下移植瘤模型, 研究康莱特注射液的抗胰腺癌机制, 结果发现康莱特注射液和 5-FU 均可明显提高胰腺癌细胞凋亡率, 降低细胞 Bcl-2 蛋白表达水平, 两者对 Bax 蛋白表达水平无影响, 同时明显降低移植瘤 VEGF 蛋白的表达。

为了进一步探讨薏苡仁油抗胰腺癌的作用机制, 本实验以人原位胰腺癌 BxPC-3 细胞为模型, 观察薏苡仁油体外诱导 BxPC-3 细胞凋亡、细胞周期阻滞和对血管生长因子的影响。结果表明, 薏苡仁油作用于 BxPC-3 细胞后, 瑞氏染色检测可见胞浆中有游离的凋亡小体, 细胞核固缩, 碎裂, 细胞核染色质聚积于核周, 贴近核膜等凋亡细胞的特征性改变; Hoechst 33258 荧光染色检测可见, 经薏苡仁油作用后, 细胞膜与细胞核呈浓缩致密的强蓝色荧光, DNA 琼脂糖凝胶电泳可见明显的梯形条带。上述结果均证实薏苡仁油具有诱导 BxPC-3 细胞凋亡的作用。流式细胞仪检测结果显示, 低质量浓度 (0.5 mg/mL) 薏苡仁油不影响 BxPC-3 细胞的周期, 而中、高质量浓度 (1.0、2.0 mg/mL) 的薏苡仁油

均能阻滞 BxPC-3 细胞于 G_0/G_1 期, 从而影响了 BxPC-3 细胞的生长、增殖。bFGF 和 VEGF 均对肿瘤血管形成有重要作用, 是研究肿瘤微环境的常用细胞因子, 本实验观察了薏苡仁油对这两个因子的影响。结果表明, 对照组两种因子的水平在 72 h 内是均衡地逐步上升, 说明肿瘤细胞在生长过程中可分泌调节血管生长因子, 促进肿瘤的进一步扩散; 高、中、低质量浓度 (2.0、1.0、0.5 mg/mL) 的薏苡仁油分别作用 BxPC-3 细胞 24 h 后, bFGF 和 VEGF 表达水平均下调, 48 h 时 bFGF 和 VEGF 表达水平达到至最低, 其中高质量浓度 (2.0 mg/mL) 组的抑制效果最佳, 但与中质量浓度 (1.0 mg/mL) 组的差异不明显, 48 h 后两因子的表达水平开始上升。bFGF 和 VEGF 水平得到抑制的最强时间点为 48 h 时间段, 超过 48 h 如果未补充药物则表达水平有回升趋势, 但在 72 h 时间段所有给药组 bFGF 和 VEGF 表达量仍低于对照组的水平, 这与王伟等^[13]的实验结果相似。以上结果表明薏苡仁油对肿瘤血管生成因子的表达具有显著抑制作用, 其通过抑制血管生成, 起到一定的抑制肿瘤扩散的作用。VEGF 水平对于胰腺癌生长、转移及预后有重要影响, 而微血管密度 (MVD) 则是反映肿瘤血管生成程度的良好指标, VEGF 表达程度与 MVD 显著相关^[14]。本实验证实, 薏苡仁具有阻滞 BxPC-3 细胞周期且显著抑制 BxPC-3 细胞表达 bFGF、VEGF 因子的作用, 因此推测薏苡仁油可能通过阻滞肿瘤细胞周期、抑制血管生长因子表达、控制肿瘤血管生成, 进而抑制肿瘤细胞的生长、增殖、浸润与转移, 这可能是薏苡仁油抗肿瘤的机制之一。

参考文献

- [1] Jemal A, Sicgel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2007 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57(1): 43-66.
- [2] 吴在德, 吴肇汉. 外科学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 张丰梅, 杨峻山, 赵杨景, 等. 薏苡化学成分及药理活性研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2002, 37(1): 8-11.
- [5] 杨红亚, 王兴红, 彭 谦. 薏苡仁抗肿瘤活性研究进展 [J]. *中草药*, 2007, 38(8): 附 7-附 9.
- [6] 张明发, 沈雅琴. 薏苡仁油抗肝癌的药理作用与临床应用 [J]. *现代药物与临床*, 2010, 25(6): 422-425.
- [7] 李青山, 高旭红, 刘兰芳. 薏苡仁注射液联合低剂量顺铂和 5-氟尿嘧啶治疗晚期胰腺癌的临床观察 [J]. *肿瘤*, 2004, 24(2): 184-186.
- [8] 蔡 琼, 许 健, 沃兴德. 薏苡仁油对人胰腺癌 BxPC-3 细胞影响 IL-18 表达的体外实验研究 [J]. *中医研究*, 2010, 23(7): 11-14.
- [9] 魏智勇, 韩旭鹤. 康莱特注射液的药理作用与临床评价 [J]. *中草药*, 2009, 40(7): 1166-1168.
- [10] 袁耀宗, 鲍 英, 夏 璐, 等. 应用基因芯片研究康莱特对人胰腺部位 Patu-8988 细胞的凋亡诱导作用 [J]. *中华消化杂志*, 2004, 24(8): 451-454.
- [11] 鲍 英, 夏 璐, 姜 华, 等. 康莱特诱导人胰腺癌细胞凋亡的实验研究 [J]. *上海医学*, 2004, 27(6): 412-424.
- [12] Seo Y, Baba H, Fukuda T, *et al.* High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adeno-carcinoma [J]. *Cancer*, 2000, 88(10): 2239-2245.
- [13] 王 伟, 金建光, 秦兆寅, 等. 康莱特联合 5-FU 治疗人胰腺癌 PC-3 裸鼠皮下移植瘤的实验研究 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2005, 26(5): 473-476.
- [14] Hattori Y, Gabata T, Matsui O, *et al.* Enhancement patterns of pancreatic adenocarcinoma on conventional dynamic multi-detector row CT: Correlation with angiogenesis and fibrosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(25): 3114-3121.