

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.009

· 基础研究 ·

DC-CIK 共培养细胞联合索拉菲尼对肝癌细胞体内外的杀伤效应

李 卿,王新利,王 杨,隋承光(中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所,辽宁沈阳110001)

[摘要] 目的:观察DC、CIK共培养细胞(DC-CIK)联合索拉菲尼(sorafenib)对肝癌细胞BEL-7402的体内外杀伤效应。方法:取健康人外周血单个核细胞,加入不同细胞因子促进DC及CIK细胞成熟并混合共培养。CCK8试剂盒检测DC-CIK共培养细胞联合索拉菲尼对BEL-7402细胞的体外杀伤效应,Annexin V-FITC试剂盒检测两者联合对肝癌细胞凋亡率的影响。用肝癌细胞BEL-7402建立裸鼠皮下移植瘤模型,分为生理盐水对照组、索拉菲尼组、DC-CIK组、DC-CIK+索拉菲尼组,观察它们对裸鼠移植瘤生长的抑制作用。结果:联合组对肝癌细胞的杀伤率及诱导凋亡率均明显高于各单独治疗组,联合组杀伤率高达 $(75.24 \pm 1.91)\%$,是DC-CIK组的1.8倍,是索拉菲尼单药组的2.1倍($P < 0.01$);联合组诱导肝癌细胞凋亡率达 $(78.32 \pm 2.54)\%$,与单独治疗组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。体内实验表明,DC-CIK+索拉菲尼组可明显抑制裸鼠BEL-7402移植瘤的生长,抑制率为 $(83.37 \pm 0.16)\%$,与单独治疗组相比差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。结论:DC-CIK共培养细胞联合索拉菲尼在体内、外可显著抑制肝癌细胞的生长,分子靶向治疗联合细胞免疫治疗可能成为肝癌综合治疗的方法之一。

[关键词] 肝肿瘤;树突状细胞;细胞因子活化的杀伤细胞;索拉菲尼

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)01-0046-05

In vitro and *in vivo* cytotoxicity effects of co-cultured DC-CIK cells combined with sorafenib against hepatocellular carcinoma

LI Qing, WANG Xin-li, WANG Yang, SUI Cheng-guang (Cancer Research Institute, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of DC (dendritic cell)-CIK (cytokine-induced killer cell) co-cultured cells combined with sorafenib against hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. **Methods:** DC and CIK cells were generated *in vitro* by stimulating human peripheral blood mononuclear cells with different cytokines, and then they were co-cultured. The cytotoxicity of DC-CIK co-cultured cells (DC-CIK) combined with sorafenib against BEL-7402 cells was determined by CCK8 kit. The apoptosis of BEL-7402 cells was measured by Annexin V-FITC Kit. BEL-7402-implanted tumor model was established by subcutaneous injection in nude mouse. Tumor-bearing mice were divided into normal saline control group, sorafenib group, DC-CIK group and DC-CIK + sorafenib group. The inhibitory effects were observed in different groups. **Results:** The cytotoxicity rate of BEL-7402 cells in DC-CIK + sorafenib group was significantly higher than those in the other two groups, with cytotoxicity rate in DC-CIK + sorafenib group being $(75.24 \pm 1.91)\%$, which was 1.8 times that in DC-CIK group and 2.1 times that in sorafenib group ($P < 0.01$). The apoptosis rate of BEL-7402 cells in DC-CIK + sorafenib group was significantly higher than those in the sorafenib and DC-CIK groups, with the apoptosis rate in DC-CIK + sorafenib group being $(78.32 \pm 2.54)\%$ ($P < 0.05$). The volume of tumor in the combination group was significantly smaller than those in the other groups ($P < 0.05$). *In vivo* results showed that DC-CIK + sorafenib treatment significantly inhibited the growth of BEL-7402-implanted tumors, and the inhibitory rate was $(83.37 \pm 0.16)\%$, which was significantly higher than those of the other groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** DC-CIK co-cultured cells combined with sorafenib can inhibit the growth of hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 *in vitro* and *in vivo*. Molecular targeting therapy combined with immunotherapy may be a new way for the com-

[基金项目] 辽宁省科技发展计划重点项目(No. 2008225008-5)。Project supported by the Key Science and Technology Development Program of Liaoning Province (No. 2008225008-5)

[作者简介] 李 卿(1983-),女,江西省万年县人,硕士研究生,主要从事分子肿瘤学研究。E-mail:qli0427@163.com

[通信作者] 隋承光(SUI Cheng-guang, corresponding author), E-mail: cgsui1964@163.com

prehensive treatment of hepatocellular carcinoma.

[**Key words**] hepatocarcinoma, dendritic cell, cytokine-induced killer cell, sorafenib

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 46-50]

免疫治疗及分子靶向药物对肿瘤的生物治疗取得了良好效果,并逐渐成为肝癌治疗的重要手段之一^[1]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是人体内最重要的抗原提呈细胞,能够摄取、加工、提呈抗原,激活初始 T 细胞,引发抗原特异性免疫应答^[2]。细胞因子活化的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)是外周血单个核细胞经多种细胞因子体外共培养得到的具有强大抗肿瘤活性的细胞群^[3]。研究^[4-7]发现,CIK 和同源 DC 共培养细胞(DC-CIK)较 CIK 细胞有更明显的细胞毒活性。索拉菲尼(sorafenib, 商品名多吉美),是首个口服的多种激酶抑制剂,可同时抑制丝氨酸/苏氨酸激酶和受体酪氨酸激酶,因此该药既可抑制肿瘤细胞的增殖又可抗血管生成,具有良好的抗肿瘤活性,主要用于晚期肾细胞癌的治疗^[8];目前也是第一个在肝癌治疗上获得良好疗效的分子靶向药物^[9-10],已被美国食品与药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)确定用于肝癌患者的治疗。

本研究观察 DC-CIK 共培养细胞联合索拉菲尼对肝癌细胞的体内外杀伤作用,为肝癌的综合治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂

索拉菲尼{N-(3-三氟甲基-4-氯苯基)-N-[4-(2-甲基氨基甲酰嘧啶)苯氧基]尿素}购自拜耳公司,二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司,人淋巴细胞分离液 Ficoll-Paque Plus 购自 Amersham Biosciences 公司,IFN- γ 购自上海克隆生物技术有限公司。CD3 单抗购自北京邦定生物医学公司,基因重组人 IL-2 购自山东泉港药业有限公司,基因重组人 IL-1 α 、IL-4 购自美国 PeproTech 公司,重组人粒细胞巨嗜细胞刺激因子 GM-CSF 购自厦门特宝生物工程股份有限公司。CCK8 试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究所以,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物科技发展有限公司。

1.2 实验动物和细胞株

BALB/c 裸鼠,雄性,4 周龄,15 ~ 20 g,购自北京大学动物部[许可证号:SCXK(京)2006-0008]。BEL-7402 人肝癌细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.3 细胞培养

1.3.1 CIK 细胞培养 应用 CS-3000 血细胞分离机(美国 Baxter 公司)干细胞采集程序采集健康志愿者外周血,经人淋巴细胞分离液密度梯度离心获得外周血单个核细胞(PBMC),用 PBS 洗涤 2 次,悬浮于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h,收集未贴壁细胞置于新的培养瓶中,调整细胞密度至 1×10^6 /ml,用于 CIK 细胞培养。当日加入 IFN- γ (1 000 U/ml),24 h 后加入 CD3 单抗(50 ng/ml)、IL-2(300 U/ml)、IL-1 α (100 U/ml),以后每 3 d 补加新鲜培养基,并补加 IL-2(300 U/ml)。贴壁细胞用于 DC 培养。

1.3.2 BEL-7402 肝癌细胞冻融抗原制备及 DC 细胞培养 用反复冻融法制备人肝癌 BEL-7402 细胞冻融抗原。上述贴壁细胞加入 GM-CSF(800 U/ml)和 IL-4(500 U/ml)继续培养,每 3 d 换液并补加细胞因子,于第 6 天加入肝癌 BEL-7402 细胞冻融抗原刺激物(100 μ l/ml),第 7 天加入 TNF- α (100 U/ml)诱导 DC 成熟。

1.3.3 DC 与 CIK 细胞共培养 将培养至第 8 天的 DC 与 CIK 细胞计数后按 1:5 的比例混合培养,每 3 天补加 IL-2(300 U/ml),继续培养 7 d。

1.4 CCK8 法检测 DC-CIK 共培养细胞及索拉菲尼对肝癌细胞的杀伤活性

1.4.1 索拉菲尼对肝癌细胞杀伤活性的检测 本实验用 CCK8 试剂盒检测索拉菲尼对肝癌细胞的杀伤活性。CCK-8 试剂盒是基于 WST-8 应用于细胞增殖和细胞毒性检测的试剂盒,WST-8 是类似于 MTT 的类似物,在电子螯合剂存在的情况下,可被线粒体内的脱氢酶还原成橙黄色的 formazan,颜色深浅和细胞数目呈线性关系。将索拉菲尼溶于 100% DMSO,再用 RPMI 1640 培养基稀释至所需浓度,DMSO 的终体积分数为 0.1%。同时将含 0.1% DMSO 的培养基作为溶剂对照。取对数生长期 BEL-7402 细胞,以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板,于 5% CO₂、37 °C 孵箱中培养。待细胞贴壁 24 h 后加入配制好的索拉菲尼(使终浓度分别为 6.9、13.8、20.8 μ mol/L),20 μ l/孔,设 BEL-7402 空白对照及 0.1% DMSO 溶剂对照,每组 3 个复孔。继续培养 48 h 后加入 CCK8 溶液 20 μ l/孔,37 °C 孵育 2

h 后,酶联免疫分析仪检测每孔的光密度值 (D_{450})。计算细胞增殖抑制率:抑制率(%)=(对照组 D 值-实验组 D 值)/对照组 D 值 $\times 100\%$ 。

1.4.2 DC-CIK 共培养细胞对肝癌细胞杀伤活性的检测 同上,接种肝癌 BEL-7402 细胞,于铺板 48 h 后加入不同效靶比(10:1、20:1、40:1)的 DC-CIK 共培养细胞,同时设 DC-CIK 细胞空白对照组,每组 3 个复孔。效应细胞及靶细胞共培养 24 h 后加入 CCK8 溶液 20 μl /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后,酶联免疫分析仪检测每孔的 D 值。计算杀伤活性(杀伤率),杀伤率(%)=[1-(实验组 D 值-单独 DC-CIK 细胞组 D 值)/单独 BEL-7402 细胞 D 值] $\times 100\%$ 。

1.4.3 索拉菲尼联合 DC-CIK 的杀伤活性检测 同上接种肝癌 BEL-7402 细胞,于铺板 24 h 加入不同浓度索拉菲尼(终浓度分别为 6.9、13.8、20.8 $\mu\text{mol/L}$),20 μl /孔,次日加入不同效靶比的 DC-CIK 细胞(10:1、20:1、40:1),分别记做联合组 1、联合组 2、联合组 3,继续培养 24 h,加入 CCK8 溶液 20 μl /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后,酶联免疫分析仪检测每孔的 D 值。计算公式同上。

1.5 AnnexinV/PI 检测细胞凋亡

用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。将处于对数生长期的细胞接种于 6 孔培养板,按上述方法处理细胞后,收集各组细胞,并用 PBS 洗涤 2 次,调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$,用 500 μl 结合缓冲液悬浮细胞,加入 5 μl AnnexinV-FITC 混匀后,加入 5 μl 的 PI,室温避光反应 15 min,流式细胞术检测。数据由 WinMDI 2.9 软件系统分析。

1.6 索拉菲尼、DC-CIK 及两者联用对荷瘤裸鼠移植瘤的治疗实验

于 BALB/c 裸鼠右侧前肢根部皮下注射处于对

数生长期的 BEL-7402 细胞($1 \times 10^7/\text{ml}$),0.2 ml/只。将 20 只裸鼠随机分为生理盐水对照组、索拉菲尼组、DC-CIK 细胞组、DC-CIK + 索拉菲尼组(联合治疗组)共 4 组,每组各 5 只。索拉菲尼的配制参照 Wilhelm 等^[11]的方法。索拉菲尼组灌胃给药,100 mg/kg,每日 1 次,连续 15 d;DC-CIK 细胞组给予体外培养 14 d 的 DC-CIK 共培养细胞腹腔内注射, $1 \times 10^7/\text{只}$,1 次/3 d;联合治疗组先予索拉菲尼灌胃给药,100 mg/kg,每日 1 次,同时予 DC-CIK 细胞腹腔内注射,1 次/3 d;对照组为生理盐水灌胃并腹腔内注射,其输入的数量、时间、次数与联合治疗组相同。从治疗开始每 3 d 测量肿瘤的最大纵径(a)及最大横径(b),计算肿瘤体积,肿瘤体积(V)= $0.5 \times a \times b^2$,观察肿瘤的生长情况并测量瘤大小。治疗至第 16 天以颈椎脱臼法处死所有裸鼠,取瘤,测量各组瘤重,按下面公式分别计算各组荷瘤鼠的瘤重抑制率(TWI),TWI(%)=(1-治疗组平均瘤重/生理盐水对照组平均瘤重) $\times 100\%$ 。

1.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较采用成组比较 t 检验,多样本均数差别的多重比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 索拉菲尼与 DC-CIK 联合杀伤肝癌细胞

索拉菲尼与 DC-CIK 细胞联合在一定浓度及效靶比时表现出对肝癌细胞的抑制作用明显增强,其中以索拉菲尼 20.8 $\mu\text{mol/L}$ 联合 DC-CIK 效靶比 40:1 时杀伤率最高,是 DC-CIK 组的 1.8 倍,是索拉菲尼单药组的 2.1 倍($P < 0.01$),见表 1。

表 1 DC-CIK 及索拉菲尼单独或联合治疗对肝癌细胞 BEL-7402 的杀伤率($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Cytotoxic rates against BEL-7402 cells in sorafenib and DC-CIK alone or in combination treatment groups($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	Drug dose		
	I=10:1, II=6.9 $\mu\text{mol/L}$	I=20:1, II=13.8 $\mu\text{mol/L}$	I=40:1, II=20.8 $\mu\text{mol/L}$
DC-CIK(I)	13.98 \pm 2.09	27.07 \pm 1.83	40.91 \pm 1.37
Sorafenib(II)	12.74 \pm 2.05	23.46 \pm 2.81	35.09 \pm 2.99
DC-CIK + Sorafenib	16.72 \pm 1.81	40.73 \pm 1.47*	75.24 \pm 1.91**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DC-CIK group or sorafenib group

2.2 索拉菲尼联合 DC-CIK 细胞促进肝癌 BEL-7402 细胞的凋亡

索拉菲尼联合 DC-CIK 细胞能有效促进肝癌

BEL-7402 细胞凋亡,索拉菲尼诱导肝癌细胞的凋亡率为(47.35 \pm 2.31)%, DC-CIK 诱导的凋亡率为(59.69 \pm 1.69)%,索拉菲尼与 DC-CIK 联合作用下

细胞凋亡率达(78.32 ± 2.54)%,显著高于单独治疗组($P < 0.05$,图 1)。

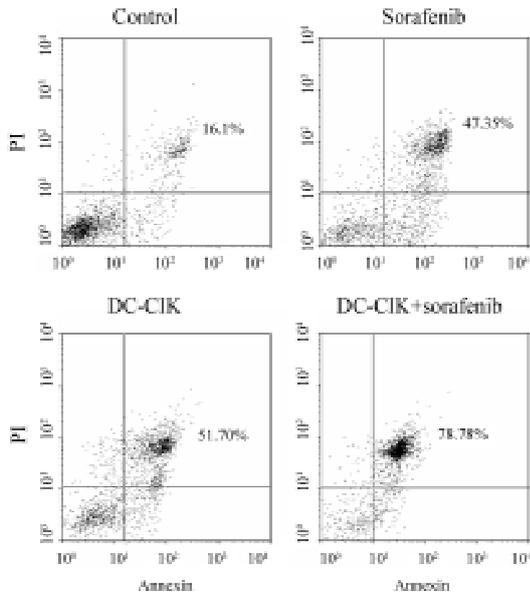


图 1 DC-CIK 及索拉菲尼单独或联合应用诱导肝癌细胞 BEL-7402 的凋亡

Fig.1 Apoptosis of BEL-7402 cells in sorafenib and DC-CIK alone or in combination treatment groups

2.3 DC-CIK 细胞及索拉菲尼抑制肝癌裸鼠移植瘤的生长

如表 2 和图 2 所示,DC-CIK 组、索拉菲尼组、联合治疗组均能抑制肿瘤生长,联合治疗组抑制效果最为明显,与索拉菲尼组和 DC-CIK 组相比,瘤重抑制率以及瘤体积的差异有统计学意义($P < 0.01$),在治疗实验中,各组裸鼠均出现进行性体重下降,实验组与对照组无明显差异($P > 0.05$),表明体重下降与肿瘤生长相关,而与药物及 DC-CIK 治疗无关。

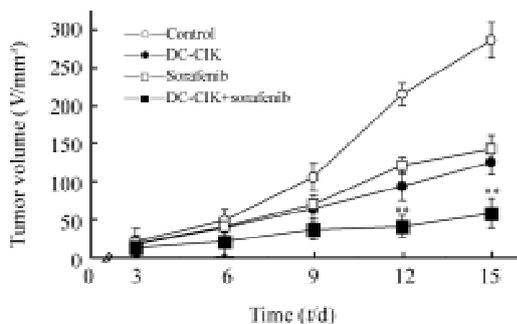


图 2 DC-CIK 及索拉菲尼单独或联合应用抑制裸鼠 BEL-7402 移植瘤的生长

Fig. 2 Sorafenib and DC-CIK alone or in combination treatments inhibited growth of BEL-7402-implanted tumors

** $P < 0.01$ vs control or DC-CIK or sorafenib group

表 2 索拉菲尼、DC-CIK 单独或联合应用对裸鼠 BEL-7402 移植瘤的抑制作用

Tab. 2 Inhibitory effects of sorafenib and DC-CIK alone or in combination treatments against BEL-7402-implanted tumors in nude mice

Group	n	Tumor mass (m/g)	Inhibitory rate (%)
Control	5	0.98 ± 0.10	
DC-CIK	5	0.74 ± 0.36	24.29 ± 0.33
Sorafenib	5	0.49 ± 0.28	49.59 ± 0.25
DC-CIK + sorafenib	5	0.16 ± 0.11	83.37 ± 0.16**

** $P < 0.01$ vs DC-CIK group or sorafenib group

3 讨论

细胞因子活化的杀伤细胞同时表达 CD3 和 CD56 两种膜蛋白分子,主要为 CD3⁺CD56⁺T 细胞,该细胞兼具有 T 淋巴细胞强大的杀瘤活性和自然杀伤细胞的非主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制性杀瘤优点^[3]。树突状细胞是体内功能强大的专职抗原提呈细胞,在细胞毒性 T 细胞的活化过程中发挥着重要的作用。采用肿瘤细胞抗原加以修饰脉冲 DC,使其获得相应的抗原信息,进一步激活 T 淋巴细胞,能够产生针对肿瘤细胞的特异性免疫反应。同时,DC 除了能诱导抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞外,还可通过直接或间接方式影响 B 细胞的增殖,活化体液免疫应答^[12]。Marten 等^[4]发现将同源 DC 和 CIK 细胞共培养后,可促进 CIK 细胞成熟,同时增强 CIK 细胞的杀瘤活性。这可能和 DC 分泌的多种细胞因子有关^[13-14]。

索拉菲尼是一种多激酶抑制剂,能够抑制丝氨酸-苏氨酸激酶(c-RAF 和突变型及野生型 BRAF)和血管内皮生长因子受体-1/-2/-3(VEGFR-1/-2/-3)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR-β)及 Flt-3、Ret 和 c-Kit 的受体酪氨酸激酶。研究证明,索拉菲尼能抑制 HepG2 和 PLC/PRF/5 两种人类 HCC 细胞系中 Raf 激酶的活性、肿瘤细胞增殖,并诱导细胞凋亡,在动物模型中也显示了广泛的抗肿瘤活性^[15]。

肝癌患者往往发现得较晚,确诊时多为晚期,且病情进展迅速,到目前为止仍没有有效的治疗方法。手术是肝癌患者治疗的主要手段之一,但是,由于晚期肝癌患者耐受性差,往往不能耐受手术及化

疗^[16]。分子靶向治疗和细胞免疫治疗是肿瘤生物治疗的两种重要方法。索拉菲尼是口服的 RAF 激酶和 VEGFR 等多激酶抑制剂,DC-CIK 共培养细胞通过静脉回输入患者体内,两者均具有毒性作用小的特点,这为两者的联合应用提供了可能。目前还未见到两者联合治疗肝癌的相关文献报道。本研究从体内体外实验两个方面验证了两者联合对肝癌细胞的抑制效应。在本实验中,索拉菲尼联合 DC-CIK 共培养细胞对肝癌 BEL-7402 细胞的杀伤效应明显高于各单独治疗组,两者联合应用能有效促进肿瘤细胞凋亡;体内实验结果显示,经联合治疗的裸鼠肿瘤生长缓慢,且治疗过程中未出现药物相关性死亡或其他明显毒性作用。

本研究证实,索拉菲尼与 DC-CIK 共培养细胞联合应用在体内外均可有效抑制人肝癌细胞 BEL-7402 的生长,其效应远大于单独用药的抑制效应;两者联合治疗的毒性作用小,患者能耐受。因此,分子靶向治疗联合细胞免疫治疗可能是肝癌综合治疗的方向之一,本研究为肝癌的生物综合治疗提供了实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2008, 48(4): 1313-1327.

[2] Bancher J, Steinman RM. Dendritic cell and the control of immunity [J]. *Nature*, 1998, 392 (66): 245-252.

[3] Schmidt-Wolf IGH ,Negrin RS, Kiem HP, Blume KG , Weissman IL. Use of a SCID mouse /human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity [J]. *J Exp Med*, 1991, 174 (1): 139-149.

[4] Marten A, Renoth S, von-Lilienfeld-Toal M, Buttgerit P, Schakowski F, Glasmacher A, *et al.* Enhanced lytic activity of cytokine-induced killer cells against multiple myelomacells after co-culture with idiotype-pulsed dendritic cells [J]. *Haematologica*, 2001, 86(10): 1029-1037.

[5] Zoll B, Lefterova P, Ebert O, Huhn D, Von Ruecker A, Schmidt-Wolf IG. Modulation of cell surface markers on NK-like T lymphocytes by using IL-2, IL-7 or IL-12 *in vitro* stimulation [J]. *Cytokine*, 2000, 12(9): 1385-1390.

[6] Marten A, Ziske C, Schottker B, Renoth S, Buttgerit P, Scha-

kowski F, *et al.* Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations [J]. *J Immunother*, 2001, 24 (6): 502-510.

[7] 陈宝安, 李 曼, 孙载阳, 李翠萍, 高 冲, 孙耕玉, 等. DC 与 CIK 共培养对肝癌细胞杀伤活性的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14 (3): 543 - 546.

[8] Ratain MJ, Eisen T, Stadler WM, Flaherty KT, Kaye SB, Rosner GL, *et al.* Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma [J] *J Clin Oncol*, 2006, 24(16): 2505-2512.

[9] Abou-Alfa GK, Schwartz I, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Finger A, *et al.* Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(26): 4293-4300.

[10] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *The New England J Medicine*, 2008, 359(4): 378-390.

[11] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, *et al.* BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral anti-tumor activity and targets the Raf/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 7099-7109.

[12] Cao XT. Dendritic cells and immunotherapy of liver cancer [J]. *Chin J Hepatol*, 2003, 11 (3): 133-134.

[13] Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response [J]. *Blood*, 1997, 90(9): 3245-3287.

[14] Marten A, Renth S, von Liliendeld-Toal M, Buttgerit P, Schakowski F, Glasmacher A, *et al.* Enhanced lytic activity of cytokine-induced killer cells against multiple myeloma cells after co-culture with idiotype-pulsed dendritic cells [J]. *Haematologica*, 2001, 86 (7): 1029-1037.

[15] Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilhelm S , *et al.* Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11851-11858.

[16] Lopez PM, Villanueva A, Llovet JM. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma-an updated analysis of randomized controlled trials [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006, 23(11): 1535-1547.

[收稿日期] 2009 - 10 - 15 [修回日期] 2009 - 11 - 20
[本文编辑] 韩 丹

