文章编号:1000-5404(2009)11-1009-04

论著

索拉菲尼诱导大鼠肝细胞癌形成过程中巨噬细胞和自然杀伤细胞的聚集

许 文,王 阁,陈 川,张志敏,李 琼,雒喜忠,郑继军,胡 庆,王 东,李增鹏 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨多分子靶点药物索拉菲尼(Sorafenib)对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)形成过程中巨噬细胞标记物CD68和自然杀伤细胞标记物CD57的分布、表达情况的影响。**方法** 改良法建立HCC模型,设立正常对照组(A组)、单纯模型组(B组)、早期单倍组(C组)、早期双倍组(D组)、晚期单倍组(E组)、晚期双倍组(F组),在HCC形成早期和晚期应用单、双倍剂量的索拉菲尼对C~F组进行干预,用免疫组织化学方法动态观察HCC组织中CD57、CD68和CD34的变化。**结果** B组CD57、CD68阳性细胞的数目逐渐增加,各个实验组(C~F组)分别在第12、14周时出现峰值后不同程度的减少,而D、F组在第18周后两者数目减少不明显,其中第20、22周时D、F组分别与B组相比均显著增加($P<0.05$),同时D组比C组,F组比E组以及D组比F组亦显著增加($P<0.01$, $P<0.05$),其余各组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。B组CD34阳性细胞数目逐渐增加,各个实验组(B~F组)在第16周后随诱癌时间延长有不同程度的减少,D组与C、E、F组相比亦显著减少($P<0.05$)。**结论** 索拉菲尼不仅可以抑制HCC组织的血管生成,还可以诱导HCC组织中的巨噬细胞和自然杀伤细胞的聚集,以早期双倍剂量组更明显,提示索拉菲尼治疗HCC的分子机制可能存在一种新的免疫调节机制,并呈剂量依赖性。

关键词: 索拉菲尼;肝细胞癌;CD68;CD57;CD34;巨噬细胞;自然杀伤细胞
中图法分类号: R73-36; R735.7; R967 **文献标识码:** A

Sorafenib induces aggregation of macrophages and natural killer cells in hepatocellular carcinoma rats

XU Wen, WANG Ge, CHEN Chuan, ZHANG Zhi-min, LI Qiong, LUO Xi-zhong, ZHENG Ji-jun, HU Qing, WANG Dong, LI Zeng-peng (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the effects of Sorafenib, a kind of multiple targeted agent, on the distribution and expression of CD68 and CD57, the markers of macrophages and natural killer cell during the course of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** HCC model was established using improved method. The subjects were divided into six groups: blank control (group A), HCC model without intervention (group B), early stage HCC model with single dose of Sorafenib (group C), early stage HCC model with double dose of Sorafenib (group D), advanced stage with single dose (group E) and advanced stage with double dose (group F). The dynamic changes in CD57, CD68 and CD34 expressions from HCC tissues were detected immunohistochemically. **Results** Count of CD57 and CD68 positive cells in group B increased gradually, but the count of these cells in groups C, D, E and F decreased at different degrees after the occurrence of the peak value at 12 and 14 weeks. No obvious change in the count of CD57 and CD68 positive cells was found in groups D and F at 18th week. At 20th and 22nd weeks, CD57 and CD68 positive cells in group D and F increased significantly as compared with those in group B ($P<0.05$), and the same result was found between groups D and C, groups F and E, and groups D and F ($P<0.01$, $P<0.05$). No significant difference was found between other groups. CD34 positive cells in group B increased gradually, but these cells in groups B, C, D, E and F decreased at 16th week

基金项目: 国家自然科学基金(30370341,30570410);教育部高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金(200261)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370341, 30570410) and the Foundation for the Author of Excellent Doctoral Dissertation of China (200261)

作者简介: 许 文,男,山东省菏泽市人,硕士研究生,医师,主要从事原发性肝癌的分子机制方面的研究。电话:(023)68757171,E-mail: shandongjchxw@tom.com
通信作者: 王 阁,电话:(023)68757171,E-mail: wangge70@hotmail.com

收稿日期: 2009-01-16;**修回日期:** 2009-02-19

in a time-dependent manner. Significant difference was found between group D and groups C, E and F ($P < 0.05$). **Conclusion** Sorafenib can not only inhibit angiogenesis of HCC, but also induce the aggregation of macrophages and natural killer cells in HCC tissues, suggesting there might be a novel dose-dependent immunoregulatory mechanism in the molecular targeted therapy of HCC treatment with Sorafenib.

Key words: Sorafenib; hepatocellular carcinoma; CD68; CD57; CD34; macrophage; natural killer cells

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)被公认是一种常见而难治的恶性肿瘤之一。化疗药物治疗因毒副作用大、疗效差而进展缓慢,分子靶向药物成为治疗HCC的希望。近年多项临床研究结果显示,索拉菲尼(Sorafenib)作为一种多激酶抑制剂,可以通过抑制血管内皮生长因子受体(VEGFR)等而阻断肿瘤新生血管的形成,间接抑制肿瘤细胞的生长,并成为第一个被证实能改善晚期HCC患者生存的药物[1]。肿瘤的发生、发展与肿瘤及肿瘤周围组织的免疫状态密切相关,有研究表明在机体免疫扮演重要角色的巨噬细胞(macrophage,Mφ)和自然杀伤(natural killer,NK)细胞,同样在抑制肝脏肿瘤形成、生长、转移中发挥重要作用[2-4]。索拉菲尼显著抑制HCC作用是否可以改善或增强HCC组织中局部细胞免疫的状态,目前尚少报道。本实验采用改良法建立HCC模型,在HCC形成早期和晚期使用单、双倍剂量的索拉菲尼进行干预,采用免疫组化动态观察其对HCC组织中Mφ、NK细胞和血管形成的影响,从细胞免疫的角度来探讨索拉菲尼抗肿瘤作用中可能存在的免疫机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

清洁级Wistar雄性近交系大鼠144只,体质量130~150 g,购自本院实验动物中心,按清洁级动物要求养在半屏障系统中。实验开始前适应性饲养3 d,按体质量随机区组分为6组:正常对照组(A组)24只,单纯模型组(B组)24只,早期单倍组(C组)24只,早期双倍组(D组)24只,晚期单倍组(E组)24只,晚期双倍组(F组)24只。CD34、CD57购自上海博士德生物技术公司,CD68购自北京博奥森生物技术公司,二乙基亚硝胺(DEN)购自美国Sigma公司,索拉菲尼为拜耳公司赠送。

1.2 方法

1.2.1 模型制作 A组大鼠饮用灭菌食用水,实验组(B~F组)大鼠饮用使用灭菌食用水,配制浓度为99 μg/ml的DEN溶液4周后,停用DEN溶液,改饮灭菌食用水4周,然后继续饮用DEN溶液(浓度同前)至实验结束。A、B组大鼠喂养普通饲料。于第9周开始每天称量C、D组大鼠食量,平均约25 g,第9周末C、D组平均体质量约为250 g,C、D组分别按照3.33 mg·kg^{-1}·d^{-1}和6.67 mg·kg^{-1}·d^{-1}将索拉菲尼溶入蒸馏水中,将该水放入普通粉状饲料中拌匀,常规烘打饲料,并于第10周末用该饲料喂养。于第16周开始每天称量E、F组大鼠食量,平均约30 g,第16周末E、F组平均体质量约为300 g,E、F组索拉菲尼药物用量计算方法分别同C、D组,于第16周末开始喂养该饲料。注意烘打饲料过程中机器温度不宜过高。

1.2.2 标本收集 分别于第10、12、14、16、18、20、22周处死各组大鼠,之后立即心内抽血,剖腹肉眼观察,取肝脏组织,部分组织固定的标本脱水,石蜡包埋、切片,常规HE染色、镜检,其余组织用生理盐水冲洗后放入液氮罐中保存。

1.2.3 免疫组织化学染色及结果评判 采用免疫组织化学染色(S-P)法。4 μm连续石蜡切片,60 ℃烤箱加热4 h;二甲苯脱蜡,乙醇梯度水化,3% H_2O_2-甲醇室温封闭10 min,0.01 mmol/L枸橼酸盐缓冲液浸泡后微波抗原修复(CD57不予修复),滴加一抗(工作浓度CD68,1∶500;CD57,1∶200;CD34,1∶100),4 ℃过夜,PowerVision™复合物50 μl,37 ℃孵育30 min,DAB显色,苏木精复染,1%盐酸酒精分化,饱和碳酸锂蓝化,常规乙醇梯度水化,二甲苯透明,DPX封片保存。以PBS代替一抗作阴性对照。CD68、CD57、CD34以细胞质或膜内出现棕黄色信号为阳性细胞,随机观察至少10个高倍镜(×400)视野,算出1个高倍镜视野中阳性细胞的平均数。

1.3 统计学分析

应用SPSS 10.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 一般情况

A组大鼠一般状况好,强壮、活泼,实验B~F组一般状况差,毛发紊乱、消瘦,呈恶病质。大体观察,B~F组大鼠早期肝脏表面变粗糙,质地较柔软,边缘锐薄,切面呈斑驳状,之后肝脏表面和实质内出现大小不等的结节,个别直径>3 cm,甚至出现血性腹水,至实验结束均形成HCC,有结节型、巨块型和弥漫型。A、B、E、F组整个实验过程均无死亡,C、D组分别在第22、20周各有1只死亡。

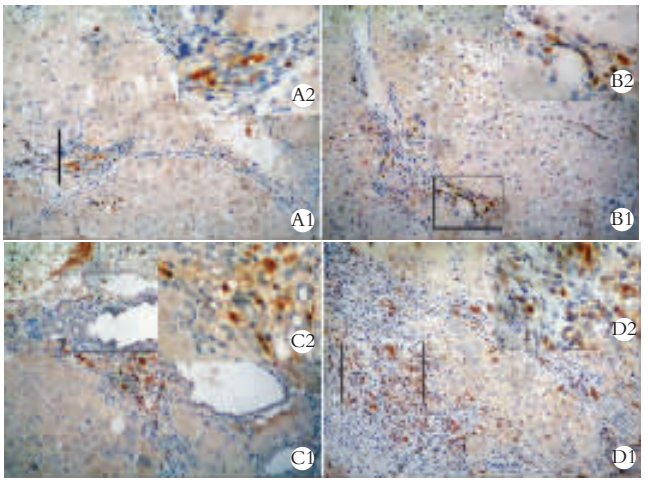
2.2 HE染色病理形态观察

A组经常规病理HE染色未发现肝脏异常。各实验组病理形态观察显示,肝脏呈慢性病变态势,即早期血窦扩张充血,肝细胞水肿,出现点状坏死,胆汁淤积;随着病变加重,病变逐渐扩展到周边带,碎屑样坏死,之后开始出现肝细胞结节性增生,结节周围开始被网状纤维围绕,纤维分隔逐渐完整,假小叶出现,肝硬化形成;从12周开始出现圆形或卵圆形HCC细胞,细胞核大小不一,核仁不明显,窦内含枯否细胞(KC),之后肝细胞呈多边形,伴囊泡状核和明显核仁,细胞排列形态不一,有的呈粗梁状,出现核分裂象,瘤巨细胞较多,与B组相比,C~F组从第18周开始出现Mφ、NK细胞增多现象,以D组最明显。

2.3 免疫组织化学检测结果

2.3.1 CD68阳性细胞的表达情况 A组随诱癌时间延长,CD68阳性细胞并无明显增加,但形态上发生改变,在第12~18周Mφ细胞大部分呈纺锤形或星形,仅有少量呈卵圆形;20周

以后,晚期 HCC 组织卵圆形巨噬细胞明显增加。各个实验组 CD68 阳性细胞的表达在 14 周时出现峰值,之后随诱癌时间延长有所减少,B、C、E、F 组较第 14 周时明显减少($P<0.05$),而 D 组减少不明显($P>0.05$);从 18 周开始,D、F 组与 B 组相比显著增加($P<0.05$),同时 D 组比 C 组,F 组比 E 组,D 组比 F 组亦有显著增加($P<0.05$)。见图 1,表 1。



A、C:单纯模型组;B、D:早期双倍组;A、B:第 14 周;C、D:第 22 周
(A1、B1、C1、D1 为放大 40 倍,A2、B2、C2、D2 为放大 400 倍)

图 1　免疫组织化学法观察 HCC 组织中 CD68 的表达　(S-P)

2.3.2　CD57 阳性细胞的表达情况　　CD57 在以细胞质或膜内表达为棕黄色,呈圆形或椭圆形。各组表达在 12 周时出现峰值,之后随诱癌时间延长各组的表达有所减少,其中在第 14 ~ 18 周 B ~ F 组基本一致,但第 20 周之后 D、F 组减少较 B 组明显缓慢($P<0.05$)。见表 2。

2.3.3　CD34 阳性细胞的表达情况　　A 组肝脏组织只有少量或几乎没有 CD34 的表达。随着模型诱癌时间的延长,肝脏损伤的加剧,CD34 表达增加,但主要在肝窦表达,呈扁平或细长。而诱癌成功后,除了肝窦处,CD34 在肝组织中的分布比较分散,但表达强度仍较前期增加。B ~ F 组 CD34 阳性细胞数从 12 周开始较 A 组明显增加($P<0.05$),B ~ F 组在第 16 周后随诱癌时间延长有不同程度的减少,D 组与 C、E、F 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

3　讨论

CD57 是白细胞具有的一种糖蛋白,抗 CD57 抗体首先用于检测淋巴细胞亚群中的 NK 细胞。NK 细胞杀伤肿瘤细胞不需要预先致敏,其可能参与机体抗肿瘤生长的第一道防线,并与一些恶性肿瘤的发生、发展及预后有密切关系[3]。与体内其他部位的 NK 细胞相比,肝脏 NK 细胞有较强的细胞毒活性和肿瘤细胞杀伤能力[5]。CD68 抗原是各种组织中 Mφ 的标记,可以用来确认肝脏中的 Mφ[6-8]。Mφ 具有吞噬、代谢、产生细胞因子及抗肿瘤免疫等多种功能,在宿主防御机制方面有重要作用[9,10]。CD34 的表达与内皮细胞的增殖有关,被认为是在肿瘤组织的血管内皮细胞上表达,具有特异性,并在一定程度上可以反应肝脏组织损

表 1　不同诱癌时间对各组 CD68 阳性细胞表达的影响($n=24$, $\bar{x}\pm s$)

组别	10 周	12 周	14 周	16 周	18 周	20 周	22 周
正常对照组	38.50 ± 7.33	40.80 ± 5.44	43.00 ± 6.22	46.30 ± 9.18	48.50 ± 4.04	47.30 ± 4.35	45.80 ± 4.35
单纯模型组	42.80 ± 7.41	47.75 ± 4.86	50.30 ± 8.85	46.30 ± 5.62	44.00 ± 5.77	42.00 ± 3.37	39.00 ± 7.75
早期单倍组	42.00 ± 6.78	48.30 ± 5.44	50.00 ± 3.65	48.50 ± 7.55	47.30 ± 5.56	45.30 ± 4.50	46.00 ± 6.68[a]
早期双倍组	42.00 ± 6.06	50.80 ± 5.74	55.50 ± 8.27[a]	53.30 ± 4.79[a]	52.00 ± 3.16[a]	53.00 ± 4.97[a]	53.80 ± 6.08[b]
晚期单倍组	41.30 ± 8.09	46.00 ± 7.75	48.50 ± 7.19	45.80 ± 5.12	44.80 ± 6.40	42.50 ± 4.04	42.80 ± 6.34
晚期双倍组	43.00 ± 5.60	47.50 ± 4.43	51.30 ± 5.56	46.50 ± 6.60	49.50 ± 7.85[a]	50.30 ± 10.72[a]	50.50 ± 4.65[a]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与单纯模型组比较

表 2　不同诱癌时间对各组 CD57 阳性细胞表达的影响($n=24$, $\bar{x}\pm s$)

组别	10 周	12 周	14 周	16 周	18 周	20 周	22 周
正常对照组	5.40 ± 0.57	6.50 ± 0.67	5.80 ± 0.69	5.90 ± 0.59	5.70 ± 0.56	5.20 ± 062	5.00 ± 0.62
单纯模型组	5.70 ± 0.52	6.30 ± 0.54	5.90 ± 0.67	5.60 ± 0.76	5.10 ± 0.65	5.10 ± 0.64	4.70 ± 0.49
早期单倍组	5.30 ± 0.90	6.50 ± 0.69	6.10 ± 0.66	5.75 ± 0.73	5.40 ± 0.48	5.40 ± 0.40	5.20 ± 0.59[a]
早期双倍组	5.50 ± 0.69	6.60 ± 0.54[a]	6.20 ± 0.53[a]	6.10 ± 0.27[a]	6.20 ± 0.46[a]	5.90 ± 0.80[b]	5.80 ± 0.76[b]
晚期单倍组	5.50 ± 0.67	6.40 ± 0.91	5.90 ± 0.74	5.80 ± 0.34	5.40 ± 0.61	5.20 ± 0.48	4.70 ± 0.49
晚期双倍组	5.70 ± 0.54	6.40 ± 0.91	6.10 ± 0.66	5.90 ± 0.54	5.70 ± 0.59[a]	5.60 ± 0.52[a]	5.50 ± 0.48[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与单纯模型组比较

表 3　不同诱癌时间对各组 CD34 阳性细胞表达的影响($n=24$, $\bar{x}\pm s$)

组别	10 周	12 周	14 周	16 周	18 周	20 周	22 周
正常对照组	18.00 ± 4.97	20.00 ± 2.58	20.80 ± 4.42	21.00 ± 2.15	22.30 ± 5.37	24.80 ± 4.11	25.00 ± 4.32
单纯模型组	34.30 ± 7.63	43.30 ± 8.46	60.00 ± 9.42	71.30 ± 13.79	78.50 ± 10.21	82.00 ± 6.21	84.00 ± 6.37
早期单倍组	33.80 ± 4.03	42.80 ± 5.91	58.80 ± 4.11	67.80 ± 9.70	73.50 ± 8.27	75.80 ± 4.35[a]	77.50 ± 5.20[a]
早期双倍组	36.30 ± 7.97	39.50 ± 5.80[a]	53.80 ± 8.18[a]	64.50 ± 9.68[a]	60.00 ± 5.71[a]	57.80 ± 5.97[b]	55.00 ± 6.98[b]
晚期单倍组	34.50 ± 8.18	40.30 ± 5.73	59.50 ± 8.81	70.50 ± 15.10	72.00 ± 5.29	68.80 ± 6.70[a]	66.80 ± 5.85[a]
晚期双倍组	34.30 ± 7.63	41.30 ± 8.46	60.00 ± 9.42	71.30 ± 13.79	71.00 ± 6.21	66.00 ± 5.71[a]	62.00 ± 5.60[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与单纯模型组比较

伤程度及 HCC 的浸润、转移以及预后[11,12]。

我们分别用 CD57、CD68 和 CD34 来检测 HCC 组织中 NK 细胞、Mφ 的存在、分布情况以及 HCC 组织中的血管情况。结果表明:随着诱癌时间的延长, B 组 CD34 表达逐渐增加,索拉菲尼进行干预后,其对 HCC 血管生成有抑制作用,其中 D 组较其他组更明显($P<0.05$)。本实验中,B 组 HCC 组织中 Mφ 和 NK 细胞数量呈逐渐减少趋势,而 Mφ 形态有所改变,纺锤形或星形的 Mφ 减少,类圆形或卵圆形的 Mφ 增多。自第 18 周开始, C ~ F 组的 Mφ 和 NK 细胞数量比 B 组明显增多,其中 D 组和 C 组,F 组和 E 组以及 D 组和 F 组相比差异有统计学意义($P<0.05$),也就是说,双倍剂量索拉菲尼干预比单倍剂量对 HCC 组织中的 CD57 阳性 NK 细胞和 CD 68 阳性 Mφ 减少的抑制作用更明显,其中以早期双倍干预最明显。大量研究证实索拉菲尼能够通过抑制血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)和血小板衍生生长因子受体(PDGFR)而阻断肿瘤新生血管的形成[13-16],但有关索拉菲尼与肿瘤的免疫调节机理尚少见报道。HCC 组织中免疫耐受和免疫逃逸现象普遍存在,而 VEGF 是一种强烈的免疫抑制因子,VEGF 的过度表达造成 HCC 组织中局部细胞免疫的低下。有研究报道 VEGFR 的表达与高水平 Mφ 移动抑制因子(MIF)呈正相关[17],因此我们推测索拉菲尼抑制了 HCC 组织中 VEGFR 的高表达,也相应降低了局部免疫细胞移动抑制因子浓度,可能使 HCC 组织中的 Mφ、NK 细胞恢复免疫功能,同时可能在解除移动抑制后,外周的 Mφ、NK 细胞向 HCC 组织发生移动、聚集,进而直接吞噬或间接杀伤 HCC 细胞。本实验中以早期双倍干预组最明显,具体机制可能与肝癌早期大鼠的全身细胞免疫功能和肝功能代偿受损状态较轻有关,而肝癌晚期机体内环境的紊乱使晚期干预组的免疫调节作用难以显著发挥。

总之,索拉菲尼在体内不仅可以通过抑制 HCC 组织局部的血管生成从而抑制 HCC 细胞的生长,而且可能通过抑制局部血管生成,逆转 HCC 组织局部中的免疫抑制,诱导外周 Mφ、NK 细胞向 HCC 组织发生移动聚集,从而发挥抗肿瘤的作用,提示索拉菲尼治疗 HCC 的分子机制中可能存在一种新的免疫调节机制,并呈剂量依赖性。

参考文献:

[1] Larkin J M, Eisen T. Kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma[J]. Crit Rev Oncol Hematol,2006,60(3):216-226.

[2] Greten T F, Manns M P, Korangy F. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2006, 45(6): 868-878.

[3] Shavit Y, Ben-Eliyahu S, Zeidel A, *et al*. Effects of fentanyl on natural killer cell activity and on resistance to tumor metastasis in rats. Dose and timing study[J]. Neuroimmunomodulation, 2004, 11(4): 255-260.

[4] Li Z, Lin H, Yang S, *et al*. Murine leptin deficiency alters Kupffer cell production of cytokines that regulate the innate immune system[J]. Gastroenterology, 2002, 123(4): 1304-1310.

[5] Luo D Z, Vermijlen D, Ahishali B, *et al*. On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells[J]. World J Gastroenterol, 2000, 6(1): 1-11.

[6] Sharifi S, Hayek J, Khettry U, *et al*. Immunocytochemical staining of Kupffer and endothelial cells in fine needle aspiration cytology of hepatocellular carcinoma[J]. Acta Cytol, 2000, 44(1): 7-12.

[7] Xidakis C, Kolios G, Valatas V, *et al*. Effect of octreotide on apoptosis-related proteins in rat Kupffer cells: a possible anti-tumour mechanism[J]. Anticancer Res, 2004, 24(2B): 833-841.

[8] Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, *et al*. Differentiation and function of Kupffer cells[J]. Med Electron Microsc, 2004, 37(1): 16-28.

[9] Sica A, Schioppa T, Mantovani A, *et al*. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(6): 717-727.

[10] Dai H, Guzman J, Chen B, *et al*. Production of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor-alpha by alveolar macrophages in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis[J]. Chest, 2005, 127(1): 251-256.

[11] Di-Carlo I, Fraggetta F, Lombardo R, *et al*. CD34 expression in chronic and neoplastic liver diseases[J]. Panminerva Med, 2002, 44(4): 365-367.

[12] Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K, *et al*. Expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells in patients with HBV-associated chronic liver diseases[J]. Int J Mol Med, 2004, 14(2): 179-184.

[13] Wilhelm S M, Adnane L, Newell P, *et al*. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(10): 3129-3140.

[14] Azad N S, Posadas E M, Kwitkowski V E, *et al*. Increased efficacy and toxicity with combination anti-VEGF therapy using sorafenib and bevacizumab[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(Suppl 18): S121.

[15] Maitland M L, Moshier K, Imperial J, *et al*. Blood pressure (BP) as a biomarker for sorafenib (S), an inhibitor of the vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(Suppl 18): S87.

[16] Posadas E, Kwitkowski V, Lie M, *et al*. Clinical synergism from combinatorial VEGF signal transduction inhibition in patients with advanced solid tumors: early results from a phase I study of sorafenib (BAY 43-9006) and bevacizumab[J]. Eur J Cancer Suppl, 2005, 3(2): S419-S420.

[17] Ren Y, Law S, Huang X, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Ann Surg, 2005, 242(1): 55-63.

(编辑 邓强庭)