

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.02.028

## DKK3 在上皮性卵巢癌中表达的初步探索

李季杨 蒋梦婉 王宏达 何秀萍<sup>△</sup>

(哈尔滨医科大学附属第一临床医学院 黑龙江 哈尔滨 150000)

**摘要 目的:**探讨 DKK3 表达与卵巢上皮性癌的关系。**方法:**采用免疫组化法检测不同卵巢组织 DKK3 蛋白表达水平,其中 88 例卵巢上皮性癌组织(以下简称卵巢癌组织)、39 例卵巢良性肿瘤组织及 46 例正常卵巢组织。**结果:**DKK3 在正常卵巢组织、卵巢良性肿瘤及卵巢癌组织的表达有明显差异,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而 DKK3 表达与上皮性卵巢癌的临床病理分期及分化程度无关( $P > 0.05$ )。**结论:**DKK3 表达水平下降与卵巢癌有关,DKK3 可作为预测卵巢癌的标志。

**关键词:**DKK3; 卵巢癌; 免疫组织化学

**中图分类号:**R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)02-308-04

## The Preliminary Study on the Expression of DKK3 in Epithelial Ovarian Cancer

LI Ji-yang, JIANG Meng-wan, WANG Hong-da, HE Xiu-ping<sup>△</sup>

(First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150000, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the relationship between DKK3 expression and the epithelial ovarian cancer (EOC). **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect the difference of DKK3 protein expression among normal ovarian tissues ( $n=46$ ), benign ovarian tumors ( $n=39$ ), and EOC ( $n=88$ ). Chi square test and Fisher's exact test were used to inspect the relevance between DKK3 expression level and clinicopathological factors. **Results:** DKK3 expression level downgraded in ovarian carcinoma ( $p < 0.05$ ). DKK3 took no responsibility for the clinicopathologic stage and differentiated degree. **Conclusions:** DKK3 showed decrease in EOC, and that DKK3 presented a potential predictor to EOC.

**Key words:** DKK3; EOC; Immunohistochemistry

**Chinese Library Classification(CLC):** R737.31 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2015)02-308-04

### 前言

卵巢癌死亡率占妇科肿瘤第一位,其中 90% 为上皮性卵巢癌<sup>[1,2]</sup>。目前对卵巢癌的主要治疗方法为外科手术及放、化疗<sup>[3]</sup>。由于缺乏早期检测手段、卵巢位于盆腔深处、早期症状不明显,仅 19% 的卵巢癌患者能在癌组织突破卵巢前发现,大多数患者就诊时已处于晚期,且卵巢癌易腹腔转移及复发,对化疗药物耐药<sup>[4,5]</sup>。另外,卵巢上皮性癌组织类型多,包括浆液性癌、粘液性癌、子宫内膜样癌、透明细胞癌等,而每种类型又有其独特的发病机制,这些都导致上皮性卵巢癌预后差,5 年生存率低。因此卵巢癌的早期诊断与早期治疗成为改善预后的关键<sup>[6]</sup>。

DKK3 隶属于 DKK 家族,DKKs 家族还包括 DKK1,2,4 及 soggy, DKK3 基因位于 11p15.1,分子量为 38kDa,由两个富含半胱氨酸的 Cys1 区域和 Cys2 区域组成,两个区域间由 13 个氨基酸长度的可变区分隔<sup>[7]</sup>。DKK3 与 DKK 家族其它成员不同,它不与 Wnt 受体 LRP5/6 发生作用<sup>[8]</sup>,而与受体 Krm1/2 结合<sup>[9]</sup>。目前研究表明,DKK3 在某些永生化细胞和某些肿瘤细胞

系中的表达呈下降趋势<sup>[10,11]</sup>,DKK3 在如肝癌、宫颈癌、急性淋巴细胞白血病、胰腺癌和髓母细胞瘤等多种恶性肿瘤中表达减少<sup>[12-16]</sup>。另外,在某些肿瘤细胞系中 DKK3 表现出抗增殖的活性,这提示 DKK3 也许是种肿瘤抑制因子。然而,DKK3 在上皮性卵巢癌中的表达情况至今仍为空白,本次实验将利用免疫组织化学方法首次检测 DKK3 在不同卵巢组织中的表达,并对 DKK3 的表达与卵巢癌临床病理分期及组织分化程度的联系进行初步探讨。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料来源

收集哈尔滨医科大学附属第一医院 2006-2013 年经手术治疗并于术后病理证实的卵巢良、恶性肿瘤组织:88 例卵巢癌组织石蜡切片,其中包括 67 例浆液性卵巢上皮性癌,7 例粘液性卵巢上皮性癌,8 例卵巢子宫内膜样癌及 6 例透明细胞癌。39 例卵巢上皮良性肿瘤组织石蜡切片及 46 例因宫颈癌、子宫内膜癌切除卵巢的正常卵巢组织石蜡切片。

#### 1.2 样本资料

88 例卵巢癌患者,平均年龄 53 岁;卵巢良性肿瘤患者,平均年龄 39 岁;46 例正常卵巢组织患者,平均年龄 51 岁。根据 FIGO 临床病理分期标准,早期 (FIGO I-II 期) 卵巢癌 43 例,中、晚期 (FIGO III-IV 期) 卵巢癌 45 例;按分化程度分类:高分

作者简介:李季杨(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:13684605075,E-mail:152893698@qq.com

<sup>△</sup>通讯作者:何秀萍,电话:0451-85555911,E-mail:37169842@qq.com

(收稿日期:2014-06-17 接受日期:2014-07-15)

化 24 例,中分化 23 例、低分化 41 例;所有上皮性卵巢癌患者术前均未接受任何激素治疗、化疗及放疗,也无合并其他肿瘤。由两名病理科医师复阅病理切片,选取存档标本石蜡块进行切片。

实验试剂:一抗:DKK3 兔抗人抗体 bs-2686R (BEIJING BIOSYNTHESIS BIOTECHNOLOGY CO.LTD, Beijing, China),二抗:P.V-9000 及 DAB 显色剂(北京中杉金桥公司)。

### 1.3 实验方法

按照试剂说明书操作实行免疫组化法,蜡块切片厚 3  $\mu\text{m}$ ,脱蜡至水,放入 60  $^{\circ}\text{C}$  烤箱中,至少 2 h 以上,用 PBS(pH 7.4) 冲洗 3 min $\times$  3 次。每张切片加过氧化物酶抑制剂,以阻断内源性过氧化物酶的活性,室温下孵育 20 min。进行抗原修复:将标本放置在修复液(枸橼酸盐缓冲溶液 pH 6.0, 95  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min)中,用微波炉高火加热 10 min,室温下自来水冷却 10 min,以 1:200 比例的一抗处理切片,PBS 冲洗 3 min $\times$  3 次。去除 PBS 液,4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中过夜,PBS 冲洗 3 min $\times$  3 次,去除 PBS 液,滴加二抗,室温下孵育 20 min,PBS 冲洗 3 min $\times$  3 次,去除 PBS 液,再加新鲜配置的 DAB 溶液,显微镜下观察 3-10 min,阳性染色为棕黄色,显色完成后,自来水冲洗,苏木精复染,封片。

### 1.4 判断标准

免疫组化判断标准:所有切片均由资深医师病理医师,在相同条件下观察并作出判断,DKK3 免疫组化阳性染色为肿瘤细胞胞质内出现棕黄色颗粒或团块。判断方法:采用二次计分法,每例标本随机计数 3 个高倍视野( $\times$  400),计数每个高倍视野中阳性细胞百分比并计分,首先按染色强度计分:0 分为无色,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;再按阳性细胞百分比计分,0 分为阴性,阳性细胞数 < 10% 为 1 分,11% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 75% 为 3 分,> 75% 为 4 分。上述两项得分的乘积作为最终结果,积分  $\leq$  2 为阴性表达,积分 > 2 为阳性表达。

### 1.5 统计学分析

SAS 9.13 统计学软件,运用卡方检验和 Fisher 检验,当  $P < 0.05$  则判定为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DKK3 在上卵巢癌组织中表达下降

DKK3 主要在卵巢癌组织的胞浆中表达,有些切片中 DKK3 也在细胞核中表达。46 例正常卵巢组织中有 27 例样本呈阳性表达(阳性率为 58.7%)。39 例卵巢良性肿瘤切片中,28 例为阳性(阳性率为 71.9%)。88 例卵巢癌组织中有 35 例为阳性(阳性率为 39.7%)。免疫组织结果显示,DKK3 在三种卵巢

组织中的表达有明显差异(图 1,2,3),DKK3 在卵巢癌组织中的表达明显下降,其差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 1)。研究同时发现,DKK3 在所有卵巢组织周围的血管中也呈阳性表达(图 2)。卵巢癌组织的四种病理亚型间的 DKK3 阳性率也进行了比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 1,4,5,6 及表 2。

### 2.2 DKK3 与上皮性卵巢癌临床病理因素间的关系

本研究表明 29 例 FIGO I 期中,11 例为阳性;14 例 FIGO II 期中,6 例显示阳性;38 例 FIGO III 期中,16 例样本表现为阳性;7 例 FIGO IV 期有 2 例为阳性。统计学分析表明早期卵巢癌(FIGO I/II)与晚期卵巢癌(FIGO III/IV)DKK3 的阳性率差异无统计学意义。而且,DKK3 的表达与组织分化程度无关( $P > 0.05$ )。研究还提示 DKK3 的表达与年龄亦无统计学关联(表 2)。

## 3 讨论

本研究首次探寻了 DKK3 在上皮性卵巢癌中呈衰减式表达,此结果与此前关于宫颈癌和胰腺癌的研究相一致<sup>[13,15]</sup>。然而,在某些鳞状细胞癌中 DKK3 表达呈增高态势,如食管鳞状细胞癌细胞系<sup>[21]</sup>。但本研究未对 DKK3 表达下调的机制及 DKK3 在 Wnt 通路中发挥作用的机制作进一步的探究。基于现有的知识,DKK3 在乳腺癌中表达减少是由于 DKK3 甲基化导致,并且该研究阐述 DKK3 的缺失可能会刺激非经典 Wnt 通路-PCP 通路的活性,从而增强肿瘤的侵袭性<sup>[22]</sup>。在宫颈癌中,DKK3 阻断  $\beta$ -catenin 核转录从而拮抗 Wnt 通路<sup>[19]</sup>。DKK3 在恶性胶质瘤中也通过抑制  $\beta$ -catenin 来抑制 Wnt 通路。Tatsuro 等人已经证明 DKK3 a 亚型 DNA 甲基化导致 DKK3 沉默表达。在急性淋巴细胞白血病,CpG 岛的甲基化导致 DKK3 减少<sup>[24,25]</sup>。

本研究发现 DKK3 在上皮性卵巢癌及其中的浆液性癌中的表达在年龄上是有差异的,然而,这种差异并没有统计学意义。这与 Jürgen Veeck 此前对乳腺癌中 DKK3 与年龄有关的研究不同<sup>[26]</sup>。同时,发现 DKK3 的表达水平与卵巢癌的临床病理分期之间并无统计学差异。这个结果与肝细胞癌<sup>[12]</sup>和恶性胶质瘤的结果相反<sup>[23]</sup>。揭示 DKK3 的表达与分化程度有一定关联,即分化程度越高,其阳性表达也越高。然而,可能由于样本例数不足,这种差异在统计学上没有意义。DKK3 的表达水平可能有预测肿瘤分化的意义。另外,受样本例数的影响,DKK3 在卵巢癌组织各种亚型间的表达亦无统计学差异。

应强调的是,本研究只是研究出了卵巢癌中 DKK3 的表达水平,并没有阐明其表达的机制。尽管只是初步的探索,这次研究仍清晰的证明了 DKK3 表达与卵巢癌组织间存在关联。我们

表 1 DKK3 在卵巢不同组织中的表达情况

Table 1 DKK3 expression among different ovarian tissues

	No (%)	Yes (%)	P
N	19 (41.3 %)	27 (58.7 %)	0.0022
B	11 (28.21 %)	28 (71.79 %)	
C	53 (60.23 %)	35 (39.77 %)	

注:N= 正常卵巢组织(normal ovarian tissue),B= 卵巢良性肿瘤(benign ovarian tumor),C= 卵巢癌组织(EOC)

表 2 DKK3 表达与卵巢癌临床病理的联系  
Table 2 DKK3 expression with clinicopathological factor

	No (%)	Yes (%)	P
FIGO			
I-II	26 (60.47 %)	17 (39.53 %)	0.9645
III-IV	27 (60 %)	18 (40 %)	
分化程度 Differeciation			
低分化 Low	28 68.29 %	13 (31.71 %)	0.2026
中分化 Mediate	14 (60.87 %)	9 (39.13 %)	
高分化 High	11 (45.83 %)	13 (54.17 %)	
年龄 Age			
≤ 53	26 (55.32 %)	21 (44.68 %)	0.3138
>53	27 (65.85 %)	14 (34.15 %)	
组织类型 Subtype			
浆液性癌 Serous	41 (61.19 %)	26 (38.81 %)	0.9214
粘液性癌 Mucious	4 (57.14 %)	3 (42.86 %)	
子宫内膜样癌 Endometriosis	4 (50 %)	4 (50 %)	
透明细胞癌 Clear cell	4 (66.67 %)	2 (33.33 %)	

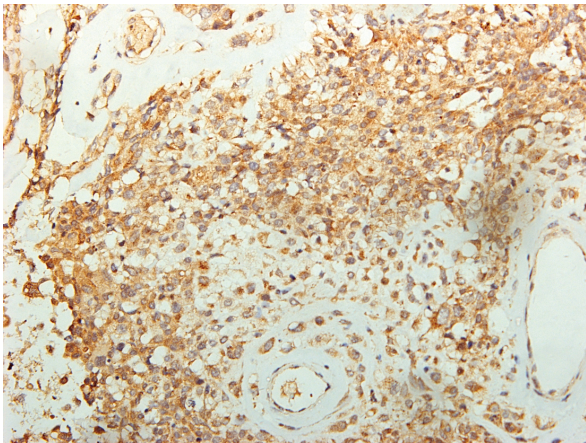


图 1 DKK3 在低分化浆液性卵巢癌中阳性表达(SP× 400)  
Fig.1 DKK3 positive expression in low differentiation serous ovarian carcinomas (SP× 400)

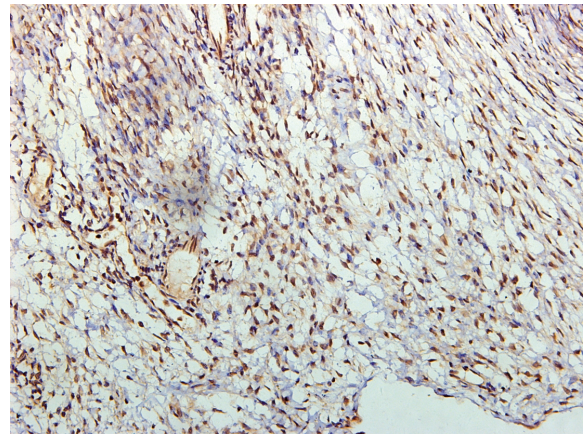


图 2 DKK3 在卵巢良性浆液性肿瘤中阳性表达(SP× 400)  
Fig. 2 DKK3 expressed positively in benign serous tumor (SP× 400)

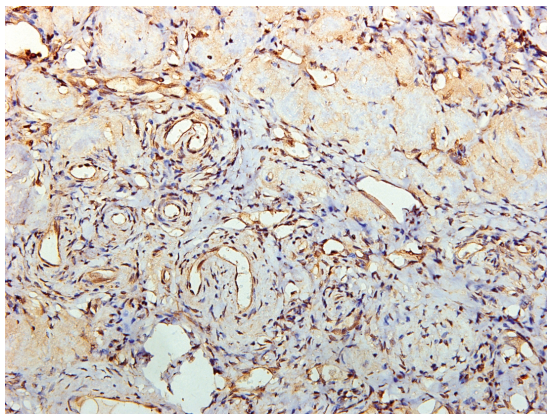


图 3 DKK3 在卵巢正常组织中阳性表达(SP× 400)  
Fig.3 The positive expression of DKK3 in normal ovarian tissue (SP× 400)

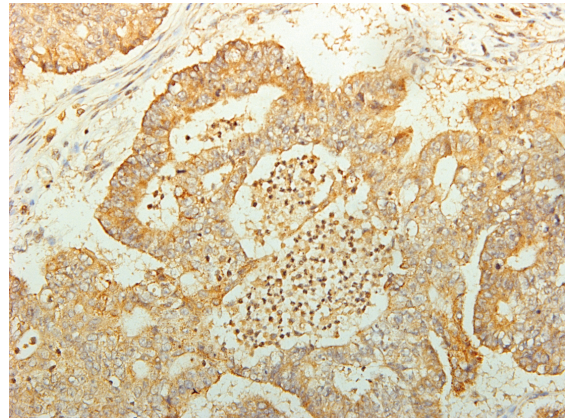


图 4 DKK3 在高分化子宫内膜样卵巢癌中阳性表达(SP× 400)  
Fig. 4 DKK3 presented positively in high differentiation endometriosis ovarian cancer (SP× 400)



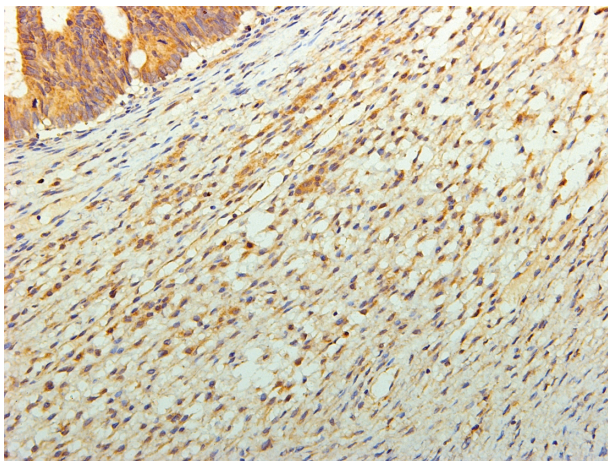


图5 DKK3 在高分化浆粘液性卵巢癌中阳性表达(SP× 400)

Fig. 5 DKK3 positive expressed in high differentiation mucinous ovarian cancer (SP× 400)

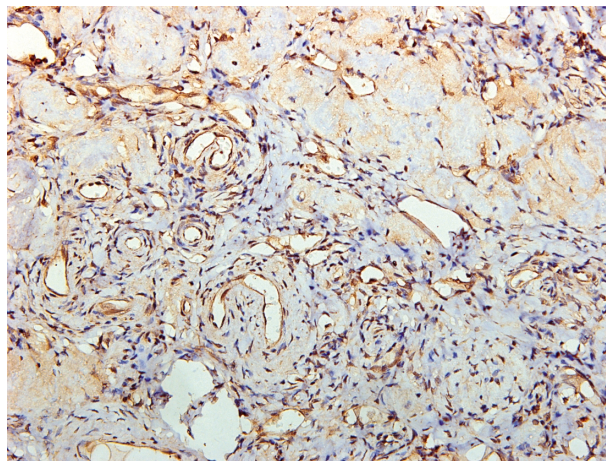


图6 DKK3 在卵巢正常组织中阴性表达(SP× 400)

Fig. 6 The negative expression of DKK3 in normal ovarian tissue (SP× 400)

接下来的目标是探求 DKK3 在卵巢癌组织中的表达机制及卵巢癌的化疗抵抗和耐药。使用去甲基化试剂使 DKK3 复表达已经应用于某些恶性肿瘤细胞系,包括胃癌、前列腺癌、肺癌和淋巴瘤等<sup>[27]</sup>。这些结果也为卵巢癌的治疗提供了新的突破口。现已证明 DKK3 与胰腺癌对吉西他滨的耐药有关。所有的信息都证明 DKK3 有成为卵巢癌治疗靶点的潜能。

#### 参考文献(References)

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics 2010[J]. CA. Cancer J. Clin, 2010, 60(5): 277-300
- [2] Weinberg RA. The Biology of Cancer, 1st [M]. New York, NY, USA : Garland Science, 2007: 28-29
- [3] Verheijen RHM, von Mensdorff-Pouilly S, van Kamp GJ. CA 125: fundamental and clinical aspects[J]. Semin Cancer Biol, 1999, 9(2): 117-124
- [4] Bast RC Jr, Urban N, Shridhar V, et al. Early detection of ovarian cancer: promise and reality[C]. Cancer Treat Res, 2002, 107(1): 61-97
- [5] Hibbs K, Skubitz KM, Pambuccian SE, et al. Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers[J]. Am J Pathol, 2004, 165(2): 397-414
- [6] Bonome T, Lee JY, Park DC, et al. Expression profiling of serous low malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary [J]. Cancer Res, 2005, 65(22): 10602-10612
- [7] Veeck J., Dahl E. Targeting the Wnt pathway in cancer: the emerging role of Dickkopf-3[J]. Biochim. Biophys. Acta, 2012, 1825(1): 18-28
- [8] Davidson G, Mao B, del Barco Barrantes I, et al. Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning [J]. Development, 2002, 129(24): 5587-5596
- [9] Rei EI, Nakamura A, Abigail S, et al. Analysis of Dickkopf3 interactions with Wnt signaling receptors [J]. Growth Factors, 2010, 28(4): 232-242
- [10] Tsuji T, Miyazaki M, Sakaguchi M, et al. REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 268(1): 20-24
- [11] Tsuji T, Nozaki I, Miyazaki M, et al. Antiproliferative activity of REIC/Dkk-3 and its significant down-regulation in non-small-cell lung carcinomas[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(1): 257-263
- [12] Ding Z, Qian YB, Zhu LX. Promoter methylation and mRNA expression of DKK-3 and WIF-1 in hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(21): 2595-2601
- [13] Eun-Ju L, Minwha J, Seung BR. Dkk3, downregulated in cervical cancer, functions as a negative regulator of  $\beta$ -catenin [J]. Int. J. Cancer, 2009, 124(2): 287-297
- [14] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X. Transcriptional silencing of the Dickkopf-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia[J]. British Journal of Cancer, 2004, 91(4): 707-713
- [15] Gu YM, Ma YH, Wu GZ. Dickkopf3 overexpression inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(33): 3810-3817
- [16] Francesca Valdora, Barbara Banelli. Epigenetic Silencing of DKK3 in Medulloblastoma[J]. Int. J. Mol. Sci, 2013, 14(4): 7492-7505
- [17] Nasu Y, Miyazaki M, Tsushima T, et al. Decreased expression of REIC/Dkk-3 in human renal clear cell carcinoma [J]. J Urol, 2004, 171(3): 1314-1318
- [18] Saeb-Parsy K, Veerakumarasivam A. MT1-MMP regulates urothelial cell invasion via transcriptional regulation of Dickkopf-3 [J]. British Journal of Cancer, 2008, 99(4): 663-669
- [19] Lindi Chen, Deborah Tweddle A. p53, SKP2, and DKK3 as MYCN target genes and their potential therapeutic significance [J]. Oncology 2012, 2(173): 1-27
- [20] Kawano Y, Kitaoka M, Hamada Y, et al. Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by dickkopf-3 [J]. Oncogene, 2006, 25(49): 6528-6537
- [21] Naoki Katase, Mathieu Lefeuvre. Absence of Dickkopf (Dkk)-3 protein expression is correlated with longer disease-free survival and lower incidence of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oncology, 2012, 3(2): 273-280
- [22] Jürgen Veeck, Nuran Bektas, Arndt Hartmann. Wnt signalling in human breast cancer: expression of the putative Wnt inhibitor Dickkopf-3 (DKK3) is frequently suppressed by promoter hypermethylation in mammary tumors [M]. Breast Cancer Research, 2008, 10(5): R82-R92

(下转第 324 页)

- Chinese Journal of Neurology, 2010, 43(1): 326-329
- [6] 韩菲,吴昊,崔丽英.卒中急性期血压管理的研究现状[J].中华神经科杂志, 2011, 44(4): 173-174  
Han Fei, Wu Hao, Cui Li-ying. Status of research in acute stroke management of blood pressure [J]. Chinese Journal of Neurology, 2011, 44(4): 173-174
- [7] 易兴阳,林静,韩钊,等.卒中后深静脉血栓形成调查及危险因素探讨[J].中华神经科杂志, 2011, 44(8): 112-114  
Yi Xing-yang, Lin Jing, Han Zhao, et al. Survey on the deep vein thrombosis after stroke and risk factors discussed [J]. Chinese Journal of Neurology, 2011, 44(8): 112-114
- [8] 范清雨,屈秋民,张虹,等.卒中后认知功能变化规律及其影响因素分析[J].中华内科杂志, 2011, 50(9): 760-764  
Fan Qing-yu, Qu Qiu-min, Zhang Hong, et al. Changes of cognitive function after stroke and its impact [J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2011, 50(9): 760-764
- [9] 万志荣,李继来,杜继臣.施普善(脑活素)对急性缺血性卒中的临床疗效研究[J].中华神经医学杂志, 2011, 10(11): 183-185  
Wan Zhi-rong, Li Ji-lai, Du Ji-chen. Clinical efficacy of Cerebrolysin (Cerebrolysin) in acute ischemic stroke [J]. Chinese Journal of Neuromedicine, 2011, 10(11): 183-185
- [10] 张露远,孙晓江.脑蛋白水解物注射液的临床应用[J].中国老年学杂志, 2010, 30(4): 278-282  
Zhang Lu-yuan, Sun Xiao-jiang. The clinical application of brain protein hydrolyzate injection [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2010, 30(4): 278-282
- [11] 叶欣,陈日坚,庄大文.施普善在急性脑梗死治疗中的应用[J].中国老年康复杂志, 2011, 18(25): 96-100  
Ye Xin, Chen Ri-jian, Zhuang Da-wen. Cerebrolysin application in the treatment of acute cerebral infarction [J]. Chinese Journal of Geriatric Rehabilitation, 2011, 18(25): 96-100
- [12] 薛丽霞,孙晓江.施普善治疗急性缺血性脑卒中的随机双盲对照研究[J].中国老年学杂志, 2008, 28(7): 760-764  
Xue Li-xia, Sun Xiao-jiang. Random double-blind controlled study of Cerebrolysin in the treatment of acute ischemic stroke [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2008, 28(7): 760-764
- [13] 罗忠萍,张秀云.参芎葡萄糖注射液的临床应用进展[J].中国现代药物应用, 2009, 3(17): 147-149  
Luo Zhong-ping, Zhang Xiu-yun. Application Progress Shenxiong clinical glucose injection[J]. Chinese Modern Drug Application, 2009, 3(17): 147-149
- [14] 褚延利,聂献真.参芎葡萄糖注射液结合现代康复治疗脑梗死30例[J].中国药业, 2011, 20(8): 134-137  
Chu Yan-li, Nie Xian-zhen. Shenxiong glucose injection combined with modern rehabilitation of cerebral infarction 30 cases[J]. Chinese Medicine, 2011, 20(8): 134-137
- [15] 孙丽君,折光楠.参芎葡萄糖注射液对急性脑梗死患者血脂、血液流变学的影响[J].实用诊断与治疗杂志, 2008, 22(3): 24-29  
Sun Li-jun, Zhe Guang-nan. Shenxiong glucose in patients with acute cerebral blood lipids, blood rheology of Injection [J]. Practical Diagnosis and Therapy, 2008, 22(3): 24-29
- [16] Rymer MM, Thutchley DE. For the Stroke Team at the Mid America Brain and Stroke Institute Organizing regional networks to increase acute stroke intervention[J].Neurological Research, 2005, (suppl 1): S9-S16
- [17] 孙嫒丽,石冬梅,金辉,等.中西医结合治疗恢复期中毒性脑病患者认知功能障碍疗效[J].中国职业医学, 2013, 40(3): 218-219,223  
Sun Man-li, Shi Dong-mei, Jin hui, et al. Efficacy of traditional Chinese medicine combined with western medicine in treating cognitive impairment of acute severe toxic encephalopathy patients during convalescence [J]. China Occupational Medicine, 2013, 40(3): 218-219, 223
- [18] Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review[J]. Lancet Neurology, 2009, (04): 355-369
- [19] 刘敏,方向华.脑卒中后残疾的研究进展[J].中华流行病学杂志, 2013, 34(11): 1146-1150  
Lui Min, Fang Xiang-hua. Progress research on the disability after stroke[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2013, 34(11): 1146-1150
- [20] Munshi A, Sultana S, Kaul S. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and the risk of ischemic stroke in a South Indian population [J]. Journal of the Neurological Sciences, 2008, (12): 132-135

(上接第 311 页)

- [23] Yoshifumi Mizobuchi, Kazuhito Matsuzaki, Kazuyuki Kuwayama. REIC/Dkk-3 induces cell death in human malignant glioma [J]. Neuro-Oncology, 2008, 10(3): 244-253
- [24] Tatsuro Hayashi, Hiroaki Asano, Shinichi Toyooka. DNA methylation status of REIC/Dkk-3 gene in human malignancies [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(5):799-809
- [25] Kobayashi K, Ouchida M, Tsuji T, et al. Reduced expression of the REIC/Dkk-3 gene by promoter-hypermethylation in human tumor cells[J]. Gene, 2002, 282(1-2): 151-158
- [26] Jü rgen Veeck, Peter J Wild, Thomas Fuchs. Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer[J]. BMC Cancer, 2009, 9(1): 217-217
- [27] Veeck J., Dahl E. Targeting the Wnt pathway in cancer: the emerging role of Dickkopf-3[J]. Biochim. Biophys. Acta, 2012, 1825(1): 18-28