

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.12.023

## Dkk-1 及 Bcl-2 蛋白在人鼻腔鼻窦鳞状细胞癌中的表达及意义

陆鸿略<sup>1</sup>, 张淑君<sup>1△</sup>, 岳文慧<sup>1</sup>, 康菲<sup>2</sup>, 郝然<sup>1</sup>

(承德医学院附属医院:1.耳鼻咽喉科;2.体检科,河北承德 067000)

**[摘要]** 目的 探讨 Dickkopf-1(DKK-1)及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)蛋白在人鼻腔、鼻窦鳞状细胞癌(SNSCC)中的表达及其临床意义。方法 采用免疫组化 SP 法及 Western blot 技术分别检测 30 例 SNSCC(SNSCC 组), 38 例鼻腔、鼻窦内翻性乳头状瘤(SNIP 组)以及 20 例中鼻甲黏膜组织(对照组)中 DKK-1 和 Bcl-2 蛋白的表达情况。结果 与 SNIP 组及对照组比较, DKK-1 蛋白在 SNSCC 组中的表达明显下调, Bcl-2 蛋白在 SNSCC 组中的表达明显上调; 在 SNSCC 组中, DKK-1 及 Bcl-2 蛋白在高、中分化与低分化组中的阳性表达率分别为 100.00%、68.75%、33.33% 及 50.00%、62.50%、100.00%, 均差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 DKK-1 蛋白可能在 SNSCC 的发生和发展过程中起着重要的促进作用, 且与 Bcl-2 蛋白呈负相关, DKK-1 蛋白可能成为 SNSCC 基因治疗的新靶点。

**[关键词]** 鼻腔肿瘤; 鼻窦肿瘤; 肿瘤, 鳞状细胞; DKK-1 蛋白; Bcl-2 蛋白; 免疫组织化学

**[中图分类号]** R765.25

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)12-1652-03

## Expression and significance of Dkk-1 and Bcl-2 protein in sinonasal squamous cell carcinoma

Lu Honglue<sup>1</sup>, Zhang Shujun<sup>1△</sup>, Yue Wenhui<sup>1</sup>, Kang Fei<sup>2</sup>, Hao Ran<sup>1</sup>

(1. Department of Otolaryngology; 2. Department of Physical Examination, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the expression and significance of Dickkopf-1 (Dkk-1) and B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) protein in sinonasal squamous cell carcinoma(SNSCC). **Methods** The immunohistochemical SP method and Western blot method were adopted to determine the expression of Dkk-1 and Bcl-2 in 30 specimens of SNSCC(SNSCC group), 38 specimens of sinonasal inverted papillomas(SNIP group) and 20 specimens of middle turbinate mucosa(control group). **Results** The expression of DKK-1 protein in the SNSCC group was significantly down-regulated compared with the SNIP group and the control group, while the expression of Bcl-2 protein in the SNSCC group was significantly up-regulated compared with the SNIP group and the control group; in the SNSCC group, the positive rates of DKK-1 protein and Bcl-2 protein in the high and middle differentiation group and the low differentiation group were 100.00%, 68.75%, 33.33% and 50.00%, 62.50%, 100.00% respectively, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Dkk-1 protein may play an important promoting role in the development and progression process of SNSCC, the expression of Dkk-1 protein has a negative correlation with the expression of Bcl-2 protein in SNSCC, which may become a new target spot of SNSCC gene therapy.

**[Key words]** nasal cavity neoplasms; paranasal sinus neoplasms; neoplasms, squamous cell; Dickkopf-1; B cell lymphoma/leukemia-2; immunohistochemistry

近年来一些研究表明, Wnt 信号的异常是导致恶性肿瘤的原因之一。Dickkopf-1(DKK-1)基因是近年来发现的 Dickkopfs(DKKs)家族的一种分泌蛋白, 通过 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白(catenin)经典信号传导途径, 以及 Wnt 非经典信号传导途径在多种肿瘤的发生、发展过程中起诱导凋亡、抑制增殖和侵袭作用。然而 DKK-1 蛋白是否在鼻腔、鼻窦鳞状细胞癌(sinonasal squamous cell carcinoma, SNSCC)中起作用尚不清楚。本试验采用免疫组化方法及 Western blot 技术检测 DKK-1 蛋白在 SNSCC 和鼻腔、鼻窦内翻性乳头状瘤(sinonasal inverted papilloma, SNIP)及中鼻甲黏膜组织中的表达情况, 通过与 Bcl-2 蛋白在以上 3 种组织中的表达情况对照, 探讨 DKK-1 蛋白对 SNSCC 细胞的凋亡和增殖的调控机制, 从而明确 DKK-1 蛋白在肿瘤的发生、发展及预后中发挥的生物学作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2007 年 12 月至 2012 年 3 月本院收治的原发性 SNSCC 患者 30 例(SNSCC 组), 其中男 18 例, 女 12 例; 年龄 40~73 岁, 平均(59.10 $\pm$ 2.17)岁。肿瘤组织均经活检组织病理诊断证实, 均为患单一肿瘤, 无并发肝、肾疾患。病理组织学分级及临床分期参照 AJCC2002<sup>[1]</sup>。其中高分化 2

例, 中分化 16 例, 低分化 12 例。选取同期收治的 SNIP 患者 38 例(SNIP 组), 其中男 23 例, 女 15 例; 年龄 18~79 岁, 平均(48.40 $\pm$ 6.79)岁。另选取同期 20 例接受中鼻甲部分切除术患者的鼻腔正常黏膜组织为对照组, 其中男 11 例, 女 9 例; 年龄 15~70 岁, 平均(41.50 $\pm$ 5.19)岁。3 组患者性别及年龄比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 具有可比性。均经医院伦理学委员会同意。

## 1.2 方法

**1.2.1 主要试剂** 兔抗人 DKK-1 单克隆抗体, 购自 SANTA CRUZ 生物技术有限公司。Bcl-2 单克隆抗体、链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP)法免疫组织化学试剂盒由承德医学院附属医院病理科提供。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 二抗及 ECL 发光试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。

**1.2.2 免疫组化染色 SP 法** 常规石蜡包埋、切片、二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水, 高温、高压条件下, pH6.0 柠檬酸缓冲液修复抗原。抗 Dkk-1 及 Bcl-2 抗体的稀释浓度为 1:100, DAB 溶液显色, 苏木素复染, 设阳性和阴性对照。Dkk-1、Bcl-2 表达采用相同判定标准, 凡是细胞质内或细胞膜上出现棕黄色颗粒的

细胞为阳性细胞,每张切片随机选取 5 个不重叠的高倍视野,200 倍镜观察,每个视野计数 200 个细胞,阴性对照为细胞质或细胞膜上无棕黄色颗粒,与背景无区别;弱阳性为细胞质或细胞膜上有淡棕黄色颗粒,明显高于背景底色和阴性对照;阳性为细胞质或细胞膜上有染色较清晰的棕色颗粒,介于强弱之间;强阳性细胞质或细胞膜上有大量的深棕色颗粒。

**1.2.3 Western blot 检测** 组织标本加入 3~5 倍体积预冷细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂)制成匀浆,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液。定量蛋白水平,将样品调成相同水平,加入 5×十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶加样缓冲液,沸水煮 5 min;进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),转移至 PVDF 膜上,先后将膜与一抗、HRP 标记二抗在室温下孵育,将膜与 ECL 发光底物结合,膜与胶片在暗室结合曝光、显影、成像。胶片扫描后 GDS 凝胶成像分析系统进行光密度分析,目的条带的光密度与相应的内参 β-actin 的光密度比值即为目的蛋白表达的相对表达值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行描述分析,Western blot 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,统计方法用单因素方差分析,免疫组化结果采用  $\chi^2$  检验(必要时用校正  $\chi^2$  检验和确切概率法),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 DKK-1 在 3 组患者标本组织中的表达** Dkk-1 蛋白在对

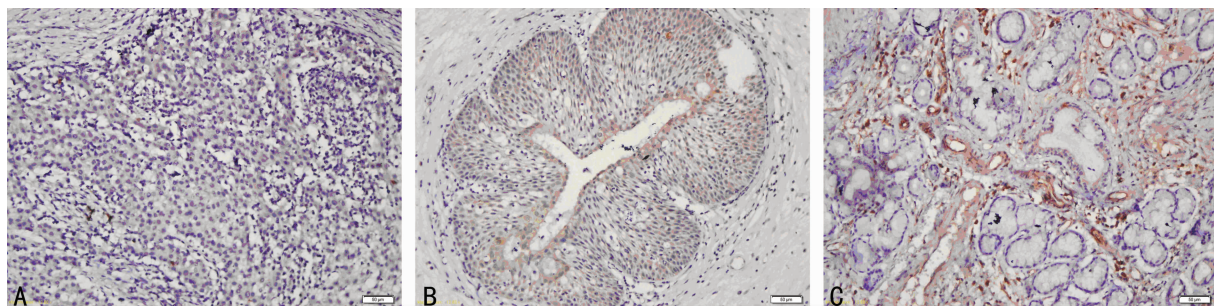
照组(85.00%)及 SNIP 组(78.95%)中的表达显著高于 SNSCC 组(56.67%);SNIP 组与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。在不同病理分级的 SNSCC 组织中的表达,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),肿瘤的分级程度越高,Dkk-1 蛋白表达水平越高,见表 1、图 1。

表 1 DKK-1 在 3 组组织中的表达及与 SNSCC 病理分级的关系[n(%)]

组别	n	阴性	弱阳性	阳性	强阳性
对照组	20	3(15.00) <sup>a</sup>	3(15.00) <sup>a</sup>	6(30.00)	8(40.00) <sup>a</sup>
SNIP 组	38	8(21.05) <sup>a</sup>	7(18.42) <sup>a</sup>	10(26.32)	13(34.21) <sup>a</sup>
SNSCC 组	30	13(43.33)	7(23.33)	7(23.33)	3(10.00)
高分化	2	0 <sup>bc</sup>	1(50.00) <sup>bc</sup>	1(50.00) <sup>bc</sup>	0 <sup>bc</sup>
中分化	16	5(31.25) <sup>b</sup>	4(25.00) <sup>b</sup>	5(31.25) <sup>b</sup>	2(12.50) <sup>b</sup>
低分化	12	8(66.67)	2(16.67)	1(8.33)	1(8.33)

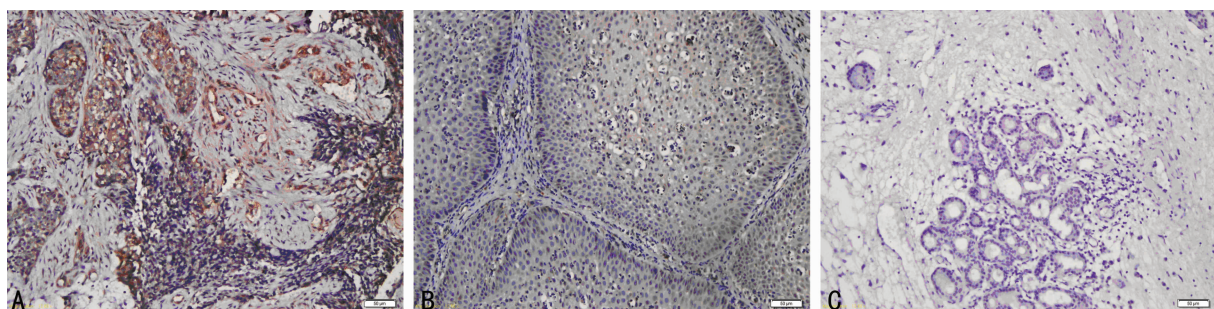
<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与 SNSCC 组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与低分化比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,与中分化比较。

**2.2 Bcl-2 在 3 组组织标本中的表达** Bcl-2 蛋白在 SNSCC 组中的表达最高(76.67%),SNIP 组次之(50.00%),在对照组中的表达最低(30.00%)。在不同病理分级的 SNSCC 组织的表达,均差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),肿瘤的分级程度越高,Bcl-2 蛋白表达水平越低,见表 2、图 2。



A; SNSCC; B; SNIP; C; 鼻腔正常黏膜组织。

图 1 DKK-1 蛋白在 3 组组织标本中的表达(SP×200)



A; SNSCC; B; SNIP; C; 鼻腔正常黏膜组织。

图 2 Bcl-2 蛋白在 3 组组织标本中的表达(SP×200)

表 2 Bcl-2 在 3 组组织中的表达及与 SNSCC 病理分级的关系[n(%)]

组别	n	阴性	弱阳性	阳性	强阳性
对照组	20	14(70.00) <sup>a</sup>	4(20.00)	2(10.00) <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
SNIP 组	38	19(50.00) <sup>a</sup>	9(23.68)	6(15.79) <sup>a</sup>	4(10.53) <sup>a</sup>
SNSCC 组	30	7(23.33)	6(20.00)	7(23.33)	10(33.33)
高分化	2	1(50.00) <sup>bc</sup>	1(50.00) <sup>bc</sup>	0 <sup>bc</sup>	0 <sup>bc</sup>
中分化	16	6(37.50) <sup>b</sup>	4(25.00) <sup>b</sup>	5(31.25) <sup>b</sup>	1(6.25) <sup>b</sup>
低分化	12	0	1(8.33)	2(16.67)	9(75.00)

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与 SNSCC 组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与低分化比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,与中分化比较。

**2.3 Western blot 检测 DKK-1 及 Bcl-2 蛋白的表达** SNSCC 组组织中均检测到不同程度的 DKK-1 及 Bcl-2 蛋白表达(图 3、4)。通过 Optimas6.0 蛋白印记分析软件蛋白条带进行分析后发现,DKK-1 蛋白在 SNSCC 组组织中的蛋白相对强度为 5.00~50.13,在 SNIP 组、对照组组织中 DKK-1 蛋白相对强度分别为 25.00~80.13,30.43~109.00,SNSCC 组中 DKK-1 蛋白表达强度明显低于 SNIP 组及对照组,均差异有统计学意义( $t = 12.7915, 10.7300, P < 0.05$ );DKK-1 蛋白在 SNIP 组中的表达与对照组比较,差异无统计学意义( $t = 1.1464, P > 0.05$ )。Bcl-2 蛋白在 SNSCC 组组织中的蛋白相对强度为 35.35~115.03,在 SNIP 组、对照组中 Bcl-2 蛋白相对强度分

别为 20.13~65.19、13~40.43, SNSCC 组中 Bcl-2 蛋白表达强度明显高于 SNIP 组及对照组, 均差异有统计学意义 ( $t=13.0786, 14.8518, P<0.01$ ); Bcl-2 蛋白在 SNIP 组中的表达与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $t=4.7956, P<0.01$ ), 见表 3。

表 3 DKK-1 及 Bcl-2 蛋白在各组的表达相对值

组别	n	DKK-1 蛋白	Bcl-2 蛋白
SNSCC 组	30	26.19±16.32	84.53±13.98
SNIP 组	38	75.67±15.45 <sup>a</sup>	45.65±10.54 <sup>b</sup>
对照组	20	81.05±19.64 <sup>a</sup>	32.51±8.58 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , <sup>b</sup>:  $P<0.01$ , 与 SNSCC 组比较; <sup>c</sup>:  $P<0.01$ , 与 SNIP 组比较。

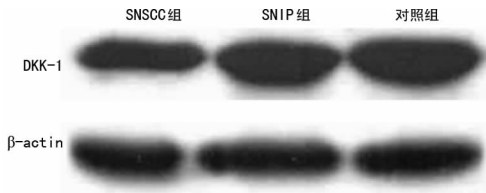


图 3 Western blot 检测 DKK-1 蛋白在 3 组组织中的表达

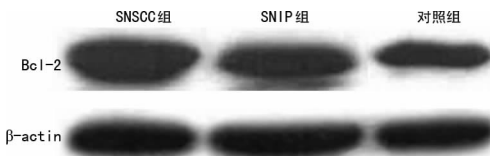


图 4 Western blot 检测 Bcl-2 蛋白在 3 组组织中的表达

### 3 讨论

鼻腔鼻窦部恶性肿瘤 (sinonasal malignant neoplasm, SMN) 在临床上较为常见, 是耳鼻咽喉头颈外科领域内位居第 3 位的来源于上皮组织的恶性肿瘤, 仅次于鼻咽癌和喉癌。在全身恶性肿瘤中占 2.05%~3.66%, 在头颈部肿瘤中约占 11.90%。在病理学上, SNSCC 是最常见的病理类型, 占鼻腔鼻窦恶性肿瘤的 70%~80%<sup>[2]</sup>。DKK-1 基因是 Glinka 等于 1998 年在两栖动物非洲蟾蜍胚胎细胞中首次发现的。其位于 10 号染色体 10q11 上, 它与细胞膜上的 Wnt 受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LDLreceptor related, LRP) 25 或 RP67 和 DKK1 共受体 Kremen1 或 Kremen2 结合形成内吞小体, 导致细胞表面 LRP 受体水平迅速下降, 使 Wnt 蛋白向细胞内传导信号机会大大降低,  $\beta$ -catenin 磷酸化, 不能进入细胞核内与转录因子 Tcf/Lcf 结合, 从而抑制细胞的增殖或活化, 调控某些肿瘤的浸润和侵袭能力<sup>[3]</sup>。有研究表明, DKK-1 在多种肿瘤中表达下调, 如人结肠直肠癌、胃肠道癌<sup>[4]</sup>、子宫颈癌<sup>[5]</sup>、成神经管细胞瘤<sup>[6]</sup>、乳腺癌<sup>[7]</sup>、白血病<sup>[8]</sup>和非小细胞肺癌<sup>[9]</sup>等。而有实验发现, DKK-1 在肝癌<sup>[10]</sup>、食管癌<sup>[11]</sup>和 Wilms' 瘤<sup>[12]</sup>细胞中表达却升高。本研究采用免疫组化方法检测 30 例 SNSCC 中 DKK-1 的表达, 其阳性率只有 56.67%, 大部分在细胞质中表达, 偶有细胞核中表达, 低于 SNIP 组 (78.95%) 与对照组 (85.00%) 中的表达, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 发现随着 SNSCC 的分化程度降低, DKK-1 的表达也随之降低。同时, 通过 Western blot 技术检测 SNSCC、SNIP、对照组组织中 DKK-1 蛋白的表达情况, 发现 SNSCC 组中 DKK-1 蛋白表达强度低于 SNIP 组及对照组, 均差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。而 DKK-1 蛋白在 SNIP 组与对照组中的表达比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。本研究结果提示, DKK-1 蛋白具有抑制肿瘤增殖和侵袭, 诱导肿瘤细胞凋亡的作用, DKK-1 蛋白可能作为抑癌基因在 SNSCC 的发生、发展中发挥作用。因此, 深入研究 DKK-1 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导通路在 SNSCC 中的

作用, 将作为 SNSCC 的治疗提供新的靶点。

本研究结果显示, 在 SNSCC 中 Bcl-2 蛋白表达的阳性率为 76.67%, 明显高于 SNIP 组 (50.00%) 与对照组 (30.00%) 中的表达, SNIP 组与对照组相比较, 也差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。另外, 本研究发现随着 SNSCC 的分化程度降低, Bcl-2 的阳性表达率则随之增高。同时, 通过 Western blot 技术检测 SNSCC、SNIP 和对照组中 Bcl-2 蛋白的表达情况, 发现三者之间两两比较, 均差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。以上结果证明了 Bcl-2 蛋白为一诱导肿瘤发生、发展, 抑制肿瘤凋亡的基因。DKK-1 和 Bcl-2 蛋白在 SNSCC、SNIP 和对照组中的表达情况有相反趋势, 提示 DKK-1 蛋白有可能通过抑制 Bcl-2 蛋白活性而发挥诱导凋亡作用。进一步印证了 DKK-1 蛋白作为凋亡促进剂在细胞凋亡中可能起着重要作用。

综上所述, DKK-1 作为一种肿瘤抑制因子在 SNSCC 的发生、发展中起着一定的作用, 由于 DKK-1 在不同肿瘤或同一肿瘤不同发展阶段表达状况不同, 可能存在尚未被人们所认识的其他作用机制, 有待进一步深入研究。DKK-1 的大量临床研究结果, 为寻找新的肿瘤标志物提供了线索, 同样, 为肿瘤患者实行 DKK-1 靶基因治疗提供了可能, 其潜在的预后及疗效预测价值, 将值得期待。

### 参考文献

- [1] 黄兆兆, 汪吉宝, 孔维佳. 实用耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 158-170.
- [2] Hasegawa Y, Goto M, Hanai N, et al. Evaluation of optimal drug concentration in histoculture drug response assay in association with clinical efficacy for head and neck cancer [J]. Oral Oncol, 2007, 43(8): 749-756.
- [3] Yamamoto H, Sakane H, Kikuchi A, et al. Wnt3a and DKK1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta2 catenin signaling [J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 37-48.
- [4] Sato H, Suzuki H, Toyota M, et al. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(12): 2459-2466.
- [5] Lee J, Yoon YS, Chung JH. Epigenetic silencing of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 in cervical cancer cell lines [J]. Gynecol Oncol, 2008, 109(2): 270-274.
- [6] Vibhakar R, Foltz G, Yoon JG, et al. Dickkopf-1 is an epigenetically silenced candidate tumor suppressor gene in medulloblastoma [J]. Neurol Oncol, 2007, 9(2): 135-144.
- [7] Suzuki H, Toyota M, Carraway H, et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer [J]. Br J Cancer, 2008, 98(6): 1147-1156.
- [8] Suzuki R, Onizuka M, Kojima M, et al. Preferential hypermethylation of the Dickkopf-1 promoter in core-binding factor leukaemia [J]. Br J Haematol, 2007, 138(5): 624-631.
- [9] Xu L, Chen Y, Song Q, et al. PDCD5 interacts with Tip60 and function as a cooperator in acetyltransferase activity and DNA damage induced apoptosis [J]. Neoplasia, 2009, 11(4): 345-354.
- [10] Patil MA, Chua MS, Pan KH, et al. An integrated data analysis approach to characterize genes highly expressed in hepatocellular carcinoma [J]. Oncogene, 2005, 24(23): 3737-3747.

尽量避免使用柴草等生物燃料,可使用有烟囱的炉灶,避免室内空气污染、通风不良对呼吸道造成的损害。

在环境发病因素中,世界范围内几乎所有国内外研究资料都显示,吸烟是 COPD 的危险因素,并且吸烟支数越多,患 COPD 的风险越大。吸烟者比不吸烟者更容易发生呼吸道症状和肺功能的异常,COPD 患者 FEV1 每年下降速率更快,病死率更高<sup>[18]</sup>。在本研究中,合并相关统计量结果发现,吸烟与 COPD 发病中度相关,人群归因危险度百分比占第 2 位,仅次于使用煤及生物燃料所致室内污染。长期吸烟可使支气管纤毛受损、变短,影响其清除功能,有害气体的刺激下使呼吸道巨噬细胞、嗜中性粒细胞和弹性蛋白酶、胶原酶增多,导致肺泡壁间隔破坏和间质纤维化,肺泡结构完整性遭到破坏而形成肺气肿。因此,戒烟对预防 COPD 最主要,尤其在中国,人口基数大,烟民众多,因此控烟被认为是目前防治 COPD 恶化进展的经济有效的措施。

呼吸疾病家族史和儿童时期反复呼吸道感染史也是 COPD 发病的重要因素,两者均与 COPD 发病相关,呼吸疾病家族史与 COPD 的关系已毋庸置疑,儿童时期反复呼吸道感染提示存在气道高反应,反复呼吸道感染可对呼吸道黏膜的防御能力造成损害,并可能启动免疫发病因素参与 COPD 的发病。另外,职业性粉尘和化学物质暴露也是 COPD 发病的重要因素,合并 OR 值及 95%CI 为 1.82(1.04~3.18),合并统计量有统计学意义,PARP 为 11.60%,提示加强职业粉尘和化学物质管理,避免接触类似物质是预防 COPD 的一个重要举措。此外,本研究结果还显示,低 BMI 和文化程度低也是 COPD 发病的危险因素,低体质量发病的原因可能与 COPD 患者存在气道和全身炎症导致骨骼肌萎缩体质量下降有关,而且与健康人比较,低 BMI COPD 患者的肺功能更差<sup>[19]</sup>;而文化程度低常常是社会地位差的反映,文化程度低的患者可能生活及工作环境更差,对污染材料的接触机会更多,而且对卫生保健防护知识缺乏了解,因而患 COPD 的风险越大。本研究的局限性:(1)检索过程中可能有诸多原因未能获取未发表的文献,因而可能存在潜在的发表偏倚;(2)在设计资料分析统计分析过程中也可能存在偏倚,但本研究对原文献采用了 Lichtenstein 等<sup>[2]</sup>提供的文献评价标准对纳入的文献严格评价,也在一定程度上保证了 Meta 分析结果的可靠性。

## 参考文献

- [1] Zhong NS, Wang C, Yao WZ, et al. Prevalence of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in China A Large, Population-based Survey[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(8):753-760.
- [2] Lichtenstein MJ, Mulrow CD, Elwood PC. Guidelines for reading case-control studies[J]. *J Chronic Dis*, 1987, 40(9):893-903.
- [3] 运玲,徐应军,喻昌利,等.唐山市农村地区慢性阻塞性肺疾病危险因素病例对照研究[J]. *中国慢性病预防与控制*, 2009, 17(5):498-500.

制,2009,17(5):498-500.

- [4] 史清明,张宜文,倪进发.慢性阻塞性肺病危险因素病例对照研究[J]. *安徽预防医学杂志*, 2002, 8(4):209-212.
- [5] 徐昕,夏书月,刘献萍,等.慢性阻塞性肺疾病危险因素病例对照研究[J]. *中国慢性病预防与控制*, 2008, 16(5):471-473.
- [6] 李文峰.慢性阻塞性肺疾病患病危险因素病例对照研究[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(8):2009-2012.
- [7] 苏晴,葛艳,张勇,等.慢性阻塞性肺疾病危险因素的 1:2 病例对照[J]. *中国实用医刊*, 2011, 38(8):76-78.
- [8] 陈伟国,毛锐.慢性阻塞性肺疾病患病危险因素分析——1:1 病例对照研究[J]. *广东药学院学报*, 2008, 24(2):188-189.
- [9] 徐斐.慢性阻塞性肺病的流行病学研究[D].南京:南京医科大学,2008.
- [10] 郭元.广州居民 COPD 危险因素的病例-对照研究[D].广州:广州医学院,2011.
- [11] Wynder EL, Higgins IT, Harris RE. The wish bias[J]. *J Clin Epidemiol*, 1990, 43(6):619-621.
- [12] Raherison C, Girodet PO. Epidemiology of COPD[J]. *Eur Respir Rev*, 2009, 18(114):213-221.
- [13] Ko FW, Hui DS. Air pollution and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Respirology*, 2012, 17(3):395-401.
- [14] Kurmi OP, Semple S, Simkhada P, et al. COPD and chronic bronchitis risk of indoor air pollution from solid fuel: a systematic review and meta-analysis[J]. *Thorax*, 2010, 65(3):221-228.
- [15] Ramirez-Venegas A, Sansores RH, Perez-Padilla R, et al. Survival of patients with chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(4):393-397.
- [16] Po JY, FitzGerald JM, Carlsten C. Respiratory disease associated with solid biomass fuel exposure in rural women and children: systematic review and meta-analysis[J]. *Thorax*, 2011, 66(3):232-239.
- [17] Dennis RJ, Maldonado D, Norman S, et al. Woodsmoke exposure and risk for obstructive airways disease among women[J]. *Chest*, 1996, 109(1):115-119.
- [18] Kohansal R, Martinez-Cambor P, Agusti A, et al. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(1):3-10.
- [19] 马真,卓宋明,周路球,等.体质量指数与慢性阻塞性肺疾病的相关性研究[J]. *现代预防医学*, 2011, 38(12):2417-2418.

(收稿日期:2014-10-18 修回日期:2015-02-15)

(上接第 1654 页)

- [11] Markino T, Yamasaki M, Takemasa I, et al. Dickkopf-1 expression as a marker for predicting clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(7):2058-2064.

- [12] Mikheev AM, Mikheeva SA, Rostomily R, et al. Dickkopf-1 activates cell death in MDA-MB435 melanoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352(3):675-680.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2015-02-18)