

DKK3 在慢性肾小球肾炎中表达及诱导肾小球足细胞迁移的机制研究

许为佳 李涛 费沛 程鹏 朱晓文

442000 湖北省十堰市太和医院肾内科(许为佳,李涛,费沛,程鹏);消化内科(朱晓文)

【摘要】 **目的** 研究 DKK3 在慢性肾小球肾炎中的表达,分析 DKK3 在慢性肾小球肾炎发生、发展中的意义。**方法** 选取人正常肾组织 20 例、慢性肾小球肾炎组织 80 例为研究材料,通过实时定量 PCR 和免疫蛋白印迹实验验证 DKK3 在人正常肾组织、慢性肾小球肾炎组织中的相对表达;实时定量 PCR 分析 β -catenin mRNA 在人正常肾组织、慢性肾小球肾炎组织中的相对表达,Pearson 相关性分析 DKK3 与 β -catenin 在慢性肾小球肾炎组织中的表达相关性;选取肾小球足细胞 MPC5 进行 DKK3 基因过表达,transwell 实验验证实验组和对照组中细胞迁移和侵袭的影响;免疫蛋白印迹实验验证 DKK3 对细胞迁移和侵袭的影响机制。**结果** 与正常肾组织相比,DKK3 在慢性肾小球肾炎组织中表达上调($P < 0.01$),同时 DKK3 的表达与 β -catenin 呈正相关性,并参与慢性肾小球肾炎的进展($P = 0.0002, r^2 = 0.1651$);DKK3 基因过表达后能明显促进细胞迁移和侵袭($P < 0.01$);免疫蛋白印迹实验显示 DKK3 基因过表达后能上调 Vimentin、N-cadherin、MMP7、 β -catenin 蛋白的表达,下调 E-cadherin 蛋白的表达水平($P < 0.01$)。**结论** DKK3 在慢性肾小球肾炎组织中表达上调,可能是重要的调控因子参与慢性肾小球肾炎的进展。

【关键词】 慢性肾小球肾炎;DKK3;足细胞

DOI:10.3969/j.issn.1671-2390.2019.03.006

Expression of DKK3 in chronic glomerulonephritis tissues and its induction of migration of glomerular podocytes XU Wei-jia, LI Tao, FEI Pei, CHENG Peng, ZHU Xiao-wen, Department of Nephropathy, Taihe Hospital of Shiyan, Shiyan, 442000, China

Corresponding author: ZHU Xiao-wen, E-mail: 150432651@qq.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of DKK3 in chronic glomerulonephritis tissues, and to discuss the roles of DKK3 in development and progression of chronic glomerulonephritis. **Methods** As the study object, 20 cases of normal human nephridial tissues, 80 cases of human chronic glomerulonephritis tissues were collected. With real-time quantitative PCR and Western blotting, relative expression of DKK3 in these normal human nephridial tissues and human chronic glomerulonephritis ones were examined. With Pearson correlation test, the correlation of DDK3 with expression of β -catenin in the human chronic glomerulonephritis tissues were investigated. Glomerular podocyte line MPC5 was selected to conduct over-expression of the DDK3 gene, and through Transwell migration assay effects of cell migration and invasion were explored in the test group and the control group. With Western blotting, induction of DDK3 on glomerular podocyte migration and invasion was analyzed. **Results** Compared to the normal nephridial tissues, expression of DKK3 was upregulated in the human chronic glomerulonephritis tissues ($P < 0.01$), and meanwhile exhibited positive correlation with expression of β -catenin and in-

involved in progression of chronic glomerulonephritis ($P=0.0002, r^2=0.1651$). Transwell migration and invasion assays showed that over-expression of DKK3 in the cell line MPC5 significantly promoted migration and invasion of podocytes ($P<0.001$). Furthermore, Western blotting assay indicated that over-expression of DKK3 upregulated expressions of some proteins including Vimentin, N-cadherin, MMP7 and β -catenin, and down-regulated expression of E-cadherin.

Conclusions Up-regulation of DKK3 in human chronic glomerulonephritis tissues suggests that DKK3 may be a key regulator to involve in development and progression of chronic glomerulonephritis.

【Key words】 Chronic glomerulonephritis; DKK3; Podocyte

研究显示,肾小球功能障碍、足细胞损伤和功能丢失是影响慢性肾脏病发展和蛋白尿的重要原因^[1]。近年来,我国肾脏疾病的发病率和发病人数有逐年增多的趋势,每年每百万人群中约有万人次的临床患者因各种肾脏疾病的进展而出现肾衰竭及威胁生命^[1-2]。目前,国内导致终末期肾病最常见的病因是慢性肾小球肾炎,而关于其发病的机制目前尚无明确的定论。

Dickkopf(DKK)蛋白是 WNT 信号通路的负调控因子,其家族成员主要包括了 DKK1、DKK2、DKK3、DKK4 等,其家族成员在结构上有共同的特点:都含有 1 个信号肽序列、2 段富含半胱氨酸的保守结构域和辅酯酶折叠^[1-2]。人 DKK 相关基因主要包括了 DKK1-4 等。

DKK3 即 WNT 信号通路负调控因子 3,作为 WNT 通路负调控因子,在胚胎发育、肿瘤发生、器官形成发挥着重要作用^[2],但其在肾小球肾炎的作用机制尚不清楚。本文通过研究 DKK3 在慢性肾小球肾炎组织的相对表达及 DKK3 对肾小球足细胞 MPC5 迁移和侵袭的作用,以揭示其在慢性肾小球肾炎中的作用,为其治疗寻找相应的靶点。

材料与方 法

一、病例资料

选取 2016 年 5 月-2018 年 5 月因慢性肾小球肾炎在湖北省十堰市太和医院就诊的经皮肾脏穿刺手术患者 80 例,其中男性 28 例,女性 52 例,年龄范围 8~42 岁,平均年龄(22.1±4.6)岁。慢性肾小球肾炎的诊断及病理分型参考 2003 年国际肾脏病学会和肾脏病理学会联合制定的国际标准^[3]。排除系统性红斑狼疮肾炎、多发性骨髓瘤肾损害、高血压性肾损害、糖尿病肾病等继发性肾病,无合并肝功能异常、感染及其他免疫性疾病,肾功能正常(血尿素氮<8.3 mmol/L,血肌酐<144 μ mol/L),所有病例半

年内均未使用免疫抑制剂、糖皮质激素等药物。经光学显微镜和免疫荧光检测,80 例慢性肾小球肾炎主要分为 4 种病理类型:非 IgA 系膜增生性肾小球肾炎 39 例,IgA 肾病 21 例,局灶节段硬化性肾小球肾炎 12 例,膜性肾病 8 例。正常肾脏对照起源于我院泌尿外科肾癌手术患者癌旁正常肾组织(距离肿瘤组织约 5 cm),共 20 例,其中男性 8 例,女性 12 例,年龄范围 41~78 岁,平均年龄(62.8±3.9)岁。本研究得到了太和医院伦理委员会的批准,组织标本诊断由湖北医药学院病理教研室诊断并审核;入组本研究的患者均签订知情同意书;所有患者均未接受过放疗、化疗、免疫治疗及内分泌治疗等。

二、主要试剂和耗材

小鼠肾小球足细胞(MPC5)购于上海生科所细胞库,RAPI-1640 液和胎牛血清购于美国 Gibco 公司。RNA 提取试剂盒购于美国应用生物系统公司,逆转录试剂盒产自美国 Promega 公司。蛋白提取试剂盒购于上海碧云天生物公司。实验中一抗(DKK3、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP7 和 β -actin)均购于美国 CST 实验公司,二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购于上海碧云天科技公司。实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司);酶联免疫检测仪和蛋白电泳凝胶成像仪由太和医院中心实验室公共平台提供(美国 Life Technologies 公司)。DKK3 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成及提供。引物序列:DKK3-F:5'-AG-GCAGAAGAAGCTGCTGCTA-3';DKK3-R:5'-AGCTGGTCTCCACAGCACTCAC-3'; β -catenin-F:5'-CACTCTCGAGATG GCTACTCAAGCTG-3'; β -catenin-R:5'-CTGCGGATCCTTACAGGTCAG-TATCAAAC-3。

三、组织 RNA 和蛋白提取

收集实验中临床肾组织样本,将样本提取 RNA

和蛋白,提取实验方法参考上述试剂盒中的说明书和已有的文献报道^[4-5]。胰酶消化细胞和组织,用 TRIzol 试剂抽提生长对数期的细胞,用 Nano Drop 2000 分光光度计计算 RNA 浓度。将收集的细胞和研磨成粉的组织用配制好的蛋白裂解液(每 1 mL 中含有 800 μ L T-PER 组织蛋白抽提试剂、100 μ L 磷酸酶抑制剂和 100 μ L 蛋白酶抑制剂),提取总蛋白。提取的 RNA 逆转录呈 cDNA,提取的蛋白通过 BCA 法测得浓度,实验方法参考上述试剂盒中的说明书和已有的文献报道^[4-5]。处理好的 cDNA 和蛋白保存于 -20°C 冰箱保存。

四、细胞转染

DKK3 过表达载体购于广州辉骏生物科技有限公司。质粒转染方法和步骤同文献^[6],活性状态下的小鼠肾小球足细胞(MPC5)种在六孔板中,分别转染 pcDNA3.1(+)-Flag-DKK3 或空白对照空质粒 pcDNA3.1(+)-Flag-vector(4 μ g/孔),继续培养 48 h,加入含有 G418 的 RPMI 1640 培养液,继续培养约 2 周形成单克隆,收集细胞进行相应的功能实验。转染载体:Lipofectamine-3000(美国通用应力公司)。

五、Transwell 迁移和实验

迁移实验:收集上述稳定表达 DKK3 和对照 pcDNA3.1(+)-Flag-vector 的小鼠肾小球足细胞(MPC5),消化、离心,倒置显微镜下计数,并分别取实验组和对照组 4×10^3 细胞/孔分别种于 transwell 小室上室,下室加入 15% 1640 约 700 μ L,放入细胞孵育箱中继续培养,待 20 h 后取出小室,固定、染色、计数(显微镜下随机 5 个视野),计数并评价细胞迁移能力。侵袭实验:在 transwell 小室上室中加入基质胶(无血清 1640:基质胶=1:8)混匀,基质胶小室放入细胞孵育箱中约 4~6 h,待基质胶凝固后进行侵袭实验,侵袭实验步骤基本同细胞迁移实验。

六、实时荧光 PCR

qRT-PCR 的步骤和统计方法同参考文献^[7-8],通过 qRT-PCR 表达检测 DKK3 mRNA、 β -catenin mRNA 在肾小球肾炎患者肾组织、正常肾上皮组织中的相对表达,同时通过 Pearson 检验分析 DKK3 与 β -catenin 在肾小球肾炎的相关性。qRT-PCR 上机总反应体系如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,其中内参循环 23cycle,目的循环 32cycle。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法($\Delta\text{Ct}=\text{Ct}_{\text{目的基因}}-\text{Ct}_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta\text{Ct}=\Delta\text{Ct}_{\text{待测样本}}-\Delta\text{Ct}_{\text{校准样本}}$),计算 DKK3

和 β -catenin 的 mRNA 相对表达水平。

七、免疫蛋白印迹实验

Western blot 实验方法的步骤和统计方法同参考文献^[9],提取上述组织蛋白质,采用 BCA 法测定蛋白浓度,取 45 μ g/孔进行凝胶电泳;通过十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺胶电泳分离,转膜至 PVDF 膜上;5%脱脂牛奶的 TBST 封闭 1 h 后,分别加入实验一抗(DKK3、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP7 和 β -actin,稀释比=1:500);4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中孵育 12 h。第二天常温下复温,TBST 液洗膜,二抗封闭液稀释室温下孵育 2 h,显色剂显色、成像仪曝光,并用 Quantity One 软件分析蛋白灰度值,以目的蛋白条带灰度值与内参 β -actin 之比来表示相对表达差异。

八、统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析。各实验独立重复 3 次,两独立样本数据间的比较采用双侧 t 检验;多组数据的比较采用方差分析,组内两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、DKK3 mRNA 和蛋白在慢性肾小球肾炎组织中表达上调

与正常肾组织相比,DKK3 蛋白在慢性肾小球肾炎组织中表达上调(图 1A, $P < 0.01$)。与正常肾上皮细胞相比,DKK3 mRNA 在慢性肾小球肾炎组织表达上调,差异有统计学意义(图 1B, $P < 0.01$)。

二、DKK3 与 β -catenin mRNA 在慢性肾小球肾炎组织中表达相关性

与正常肾上皮细胞相比, β -catenin mRNA 在慢性肾小球肾炎组织表达上调,差异有统计学意义(图 2A, $P < 0.01$)。相关性分析发现 DKK3 与 β -catenin 的 mRNA 表达水平有明显的正相关性(图 2B, Pearson 检验:DKK3 vs β -catenin, $P = 0.0002$,相关系数 0.1651),提示二者之间可能相互作用参与慢性肾小球肾炎的发生、发展。

三、过表达 DKK3 促进肾小球足细胞 MPC5 的迁移和侵袭

采用 Transwell 实验对细胞迁移和侵袭能力做了定量分析,结果发现稳定转染了 pcDNA3.1(+)-Flag-DKK3 实验组穿过小室的细胞显著高于对照组 pcDNA3.1(+)-Flag-Vector 组,差异具有统计学意义(图 3, $P < 0.01$)。

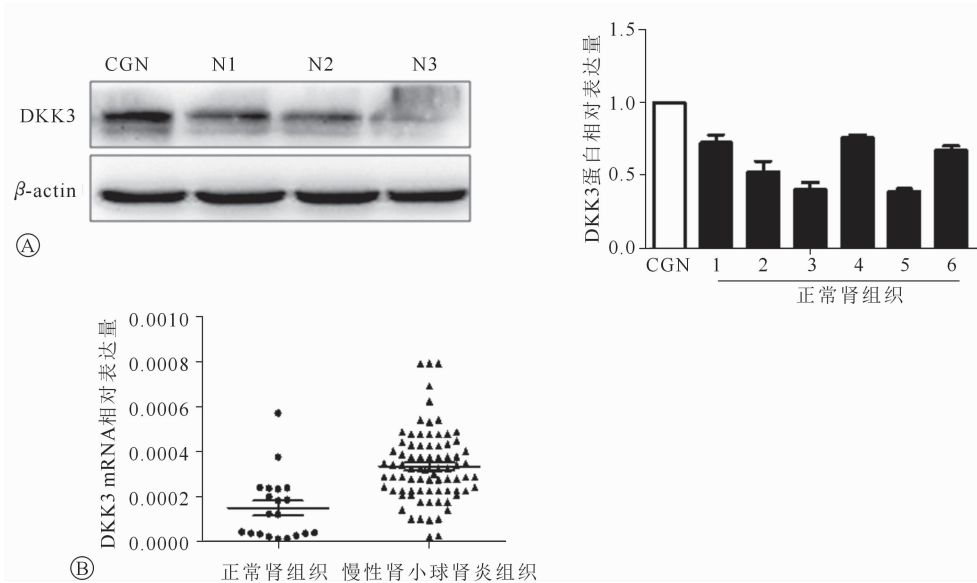
四、过表达 DKK3 促进肾小球足细胞 MPC5 的迁移和侵袭的机制研究

分别收集实验组和对照组中细胞并提取蛋白,采用蛋白质印迹检测上皮-间质转化和侵袭相关分子 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP7 及 β -catenin 的表达水平,结果显示过表达 DKK3 后, Vimentin、N-cadherin、MMP7 和 β -catenin 的蛋白(图 4, $P < 0.01$); E-cadherin 的蛋白表达水平降低(图 4, $P < 0.01$),差异具有统计学意义。

讨 论

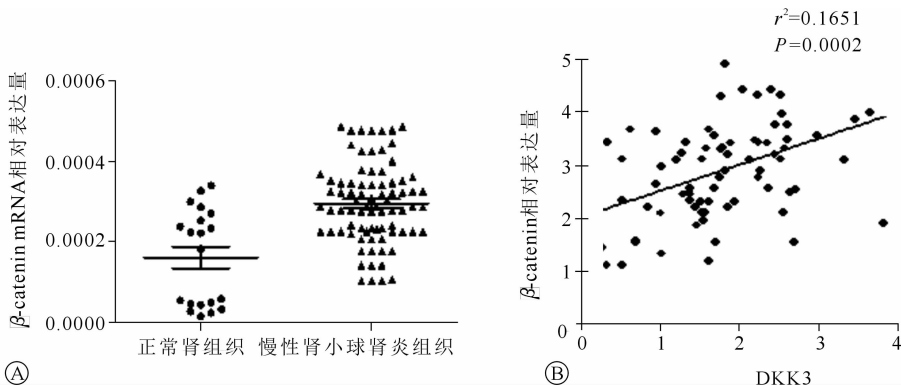
Wnt 基因是一类癌基因,包括了 19 种进化上高度保守的 WNT 蛋白,早期 WNT 信号通过缺陷可以导致多种生物的发育缺陷^[10]。在临床研究中显示,Wnt 信号通路对维持肾小球系膜细胞的稳态

和系膜基质重塑有重要作用。文献报道,Wnt/ β -catenin 信号传导和 β -catenin 核转位的增强激活在体内和体外肾小球足细胞损伤中起重要作用^[9-10];通过在体外培养的足细胞中加入嘌呤霉素,可诱导 β -catenin 的核转位,促进下游的信号转导^[9-10]。Wnt/ β -catenin 通过信号作用因子也可通过体外转化生长因子- β (TGF- γ)和阿霉素(ADR)来调节^[3-4]。在糖尿病肾病和局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)的小鼠模型中,也能观察到足细胞通过 Wnt/ β -catenin 信号影响细胞通透性^[3],而韦凤美等^[11]利用传统中成药氧化苦参碱干预阿霉素肾病鼠实验中发现氧化苦参碱通过拮抗 PS1/ γ 分泌酶系统活化,抑制 Wnt 蛋白(如 Wnt1)表达和 Wnt 信号通路,减少 β -catenin 蛋白的表达,以降低尿蛋白,保护肾功能,同时 Vicente 等^[12]发现体外实验中,足细胞在 10 μ g/ml



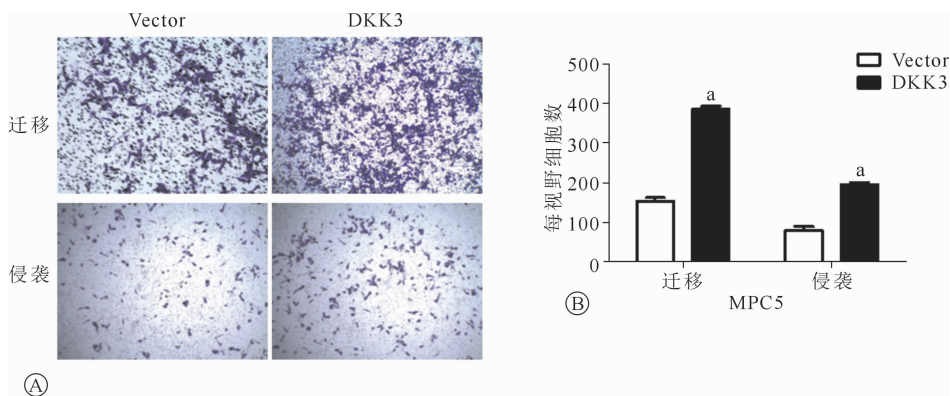
注:A:慢性肾小球肾炎组织与正常肾组织 DKK3 蛋白表达情况;B:慢性肾小球肾炎组织与正常肾组织 DKK3mRNA 表达情况

图 1 DKK3 蛋白和 mRNA 在慢性肾小球肾炎组织中表达情况



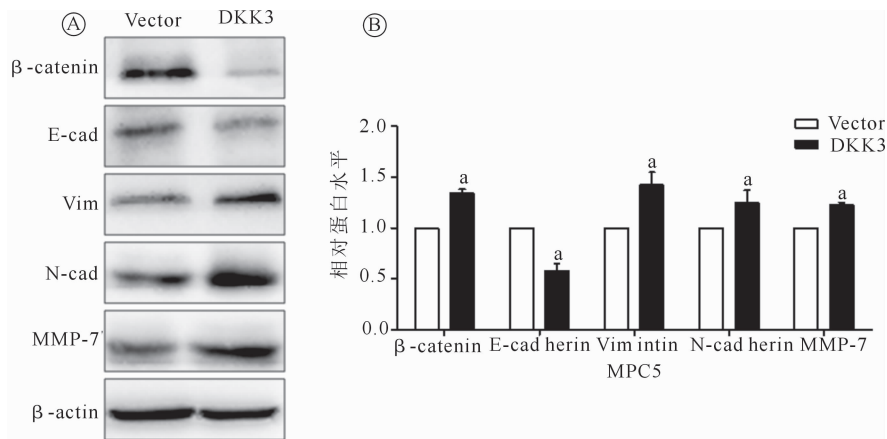
注:A:慢性肾小球肾炎组织与正常肾组织 β -catenin mRNA 表达情况($P < 0.01$);B:DKK3 与 β -catenin mRNA 表达水平相关性

图 2 DKK3 与 β -catenin mRNA 在慢性肾小球肾炎组织表达情况



注:A:Transwell 实验显示 DKK3 过表达细胞迁移和侵袭情况;B:两组细胞数比较,^a $P < 0.01$

图 3 DKK3 过表达后肾小球足细胞的迁移和侵袭情况



注:A:Western blotting 分析 DKK3 过表达后对迁移相关蛋白的影响;B:两组相对灰度值比较,^a $P < 0.01$

图 4 DKK3 过表达后对肾小球足细胞 MPC5 迁移和侵袭的影响

嘌呤霉素处理 2~3 h 后,内镜下活化 β-catenin 向核内转运,并激活下游转录因子 LEF-1,并呈现时间剂量依赖性。此项研究提示,Wnt/β-catenin 信号通路可能参与由嘌呤霉素引起的足细胞功能异常。这些结果表明,在慢性肾小球肾炎的致病机制中,足细胞中 Wnt/β-catenin 信号传导的活化可能一致。但是,所涉及的潜在作用和机制,在国内外报道中仍然知之甚少。

上皮间充质转分化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 是肾脏纤维化的关键环节。Wnt 通路异常激活导致 β-catenin 转向核内,并与转录因子 LEF/TCF 家族成员结合,激活下游基因,调节基质金属蛋白酶 (MMP7) 的表达,从而介导肾脏纤维化的发生^[13]。许多研究表明,通过 EMT 来源的成纤维细胞在各种肾脏疾病的肾纤维化中起关键作

用^[5,7,9-12]。EMT 也被认为参与了人和大鼠中肾小球新月体的组织^[13]。肾小球新月体形成是快速进展性肾小球肾炎的突出细胞生物学特征,并且与预后不良相关。Cohen 等^[14]利用微阵列研究分析发现,Wnt/β-catenin 通路异常激活会促进慢性肾小球的肾脏纤维化进程,而肾纤维化的严重程度与慢性肾炎进展及预后关系较为密切。因此,部分学者推测 Wnt/β-catenin 通路在慢性肾炎的发生及发展中起至关重要的作用。该通路的异常激活早于蛋白尿的出现^[15-16]。

现在已知 EMT 受多种调节因子调节,例如生长因子、细胞因子、激素、粘附分子、ECM 和细胞内信号分子,包括 WNT 信号通过负调控因子^[1-3]特别是 DKKs 是 Wnt/β-catenin 启动和完成 EMT 过程的关键通路。最近,已显示 Wnt 家族中在许多细胞

因子增强 EMT 的表达^[1-3], 但该研究主要集中在胚胎发育、肿瘤进展, 在组织器官的纤维化和慢性肾病的研究非常少见。

本研究发现, 与正常肾组织相比, 肾小球肾炎患者的 DKK3 mRNA 和蛋白明显增高。在慢性肾小球肾炎患者的 β -catenin mRNA 明显增高, 同时通过 Pearson 相关性分析发现, 慢性肾小球肾炎患者中 DKK3 与 β -catenin 的表达呈明显正相关性 ($P=0.0038$), 而 β -catenin 蛋白的异常活化是导致肾脏损害的重要原因。因此, 我们推测 DKK3 可能是通过调控 β -catenin 的表达从而导致肾小球肾炎的发生。机体分化发育的上皮细胞在炎症、创伤等因素下, 通过上皮间充质转变产生间质纤维母细胞, 参与组织纤维化的形成^[9,15]。上皮间充质转变是肾间质纤维化发生的重要原因, 而 WNT 信号通路的下游靶基因的 E-cadherin、MMP7 等蛋白的表达水平与 β -catenin 的表达密切相关。本研究发现, 在慢性肾小球足细胞 MPC5 中, 过表达 DKK3 基因能明显促进细胞的迁移和侵袭, 同时通过免疫蛋白印迹实验我们发现过表达 DKK3 基因后, Vimentin、N-cadherin、 β -catenin 的蛋白表达水平增高, E-cadherin 的蛋白表达水平降低 ($P<0.01$)。因此, 我们推测 DKK3 可能通过调控 β -catenin 促进上皮间充质转变, 从而影响慢性肾小球肾炎的进程。

综上所述, 本研究首次阐明了 DKK3 及 β -catenin 在慢性肾小球肾炎中发病的相关性, 证实了 DKK3 在慢性肾小球肾炎中的表达上调及促进上皮间充质转变, 有助于我们进一步了解慢性肾小球肾炎的发病及发展的机制, 同时使我们了解慢性肾小球肾炎从蛋白尿到纤维化的分子调控机制, 为慢性肾小球肾炎的治疗提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1000 patients[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2003, 82(5): 299-308.
- [2] Hamzehzadeh L, Caraglia M, Atkin SL, et al. Dickko pf homolog 3 (DKK3): A candidate for detection and treatment of cancers? [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6): 4595-4605.
- [3] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(9): 1725.
- [4] Kamiyama H, Noda H, Takata O, et al. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in peritoneal lavage and the prognosis of patients with colorectal cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2009, 100(1): 69-74.
- [5] Sun Z, Wu XY, Wu CL. The association between LncRNA HOTAIR and cancer lymph node metastasis and distant metastasis: a meta-analysis[J]. *Neoplasma*, 2018, 65(2): 178-184.
- [6] Zhang W, Glöckner SC, Guo M, et al. Epigenetic inactivation of the canonical Wnt antagonist SRY-box containing gene 17 in colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(8): 2764-2772.
- [7] You A, Fokas E, Wang LF, et al. Expression of the Wnt antagonist DKK3 is frequently suppressed in sporadic epithelial ovarian cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(4): 621-627.
- [8] Chikara S, Lindsey K, Dhillon H, et al. Enterolactone induces G1-phase cell cycle arrest in non small cell lung cancer cells by downregulating cyclins and cyclin-dependent kinases[J]. *Nutr Cancer*, 2017, 69(4): 652-662.
- [9] Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, et al. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 121(1): 11-22.
- [10] Al-Dhohorah T, Mashrah M, Yao Z, et al. Aberrant DKK3 expression in the oral leukoplakia and oral submucous fibrosis: a comparative immunohistochemical study[J]. *Eur J Histochem*, 2016, 60(2): 26-29.
- [11] Niehrs C. Function and biological roles of Dickko pf family of Wnt modulators[J]. *Oncogene*, 2006, 25(57): 7469-7481.
- [12] He W, Dai C, Li Y, et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(4): 765-776.
- [13] Dai C, Stolz DB, Kiss LP, et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(9): 1997-2008.
- [14] Stall FJ, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signaling in the immune system: WNT is spreading its wings[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(8): 581-593.
- [15] Pothoven KL, Schleimer RP. The barrier hypothesis and Oncostatin M: Restoration of epithelial barrier function as a novel therapeutic strategy for the treatment of type 2 inflammatory disease[J]. *Tissue Barriers*, 2017, 5(3): e1341367.
- [16] You A, Fokas E, Wang LF, et al. Expression of the Wnt antagonist DKK3 is frequently suppressed in sporadic epithelial ovarian cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(4): 621-627.

(收稿日期: 2018-06-03)