

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.017

• 临床研究 •

GDF15 基因在卵巢上皮性癌组织中的表达及其临床意义*

李 博¹ 张 颖^{1,2} 辛晓燕^{1△}

(1 第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710032; 2 解放军第 323 医院妇产科 陕西 西安 710054)

摘要 目的:探讨生长分化因子 GDF15(Growth Differentiation Factor 15)基因在卵巢上皮性癌组织中的表达及其与铂类耐药的相关性。**方法:**应用免疫组化、western blot、RT-PCR 等方法对 80 例原发性卵巢癌组织和卵巢癌顺铂敏感/耐药株 A2780 和 CP70、SKOV3 和 SKOV3/DDP 中生长分化因子 GDF15 表达水平进行测定。**结果:**生长分化因子 GDF15 的表达强度与卵巢癌铂类耐药性显著相关。在卵巢癌顺铂耐药株 CP70、SKOV3/DDP 中 GDF15 表达水平较顺铂敏感株 A2780、SKOV3 明显增高。**结论:**GDF15 表达水平与卵巢癌发生发展及铂类耐药相关,对于卵巢癌患者早期筛选、预测预后具有一定的临床指导价值。

关键词:卵巢肿瘤;生长分化因子 15;顺铂;耐药

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)29-5665-06

The Clinical Significance of GDF15 Expression in Human Ovarian Cancer*

LI Bo¹, ZHANG Ying^{1,2}, XIN Xiao-yan^{1△}

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, The Forth military Medical University, Xi'an Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Obstetrics and Gynecology, 323 military Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710054, China)

ABSTRACT Objective: To study the relationship of the Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) expression in human ovarian cancer and the resistant of human epithelial ovarian cancer to cisplatin. **Methods:** Expression and location of GDF15 protein was detected in specimens of 80 human epithelial ovarian cancer patients and 4 human ovarian cancer cell lines. **Results:** cytoplasmic localization of GDF15 positive staining could be observed in human epithelial ovarian cancer. The intensity of GDF15 protein was significantly correlated with FIGO, differentiation, malignant ascites, lymphatic metastasis, and platinum resistance in ovarian cancer. GDF15 mRNA levels in cisplatin resistant ovarian cancer cell lines CP70 and SKOV3/DDP increased significantly compared to those in cisplatin sensitive cell lines A2780 and SKOV3. Treated with cisplatin, GDF15 protein levels were up-regulated in both A2780 and CP70 cells. **Conclusion:** GDF15 expression appear to differ between platinum sensitive and platinum resistant ovarian cancers. Thus GDF15 expression may be useful biomarker for early screening and predicting prognosis in ovarian cancer patients.

Key words: Ovarian cancer; GDF15 gene; Cisplatin; Chemo-resistance

Chinese Library Classification: R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)29-5665-06

前言

卵巢癌死亡率位居妇科肿瘤之首。由于缺乏有效的早期诊断手段,卵巢癌起病隐匿,转移早,手术时往往出现盆腔内广泛转移粘连,彻底清除癌灶难度极大,所以术后基于铂类药物的联合化疗成为控制疾病进展的关键。然而卵巢癌患者中化疗耐药时有发生,且耐药往往伴随预后不良。卵巢癌的化疗耐药已经成为提高患者生存率的瓶颈^[1]。铂类是治疗卵巢癌的一线化疗药物,临床卵巢癌对于铂类耐药已有明确的认识和定义,然而有关铂类耐药机制的阐明却远远不足。深入认识肿瘤铂类耐药产生的机制,寻找新的治疗靶点用于耐药肿瘤的治疗对于改善卵巢癌患者预后具有重要意义。GDF15 属于转化生长因

子-β (TGF-β) 超家族成员。GDF15 基因定位于染色体 19p13.1, 包括 2 个外显子 (309bp 和 891bp) 和一个内含子 (1820bp)。GDF15 前体包含 308 个氨基酸,分子量约为 17KD, 包含一个含 29 个氨基酸的信号肽、由 167 个氨基酸组成的前肽和一个长度为 112 个氨基酸的成熟序列。蛋白前体先是在细胞内被水解,蛋白酶切除其 N 端信号肽序列,再通过二硫键将修饰后前体连接为分子量约 34KD 的二聚体,再送入内质网中折叠。之后二聚体会被特定的前体蛋白转化酶剪切修饰,并分泌到细胞外基质中。研究表明,不仅是成熟的 GDF15 蛋白能行使其生物学功能,GDF15 的前体分子也可以经由分泌作用进入细胞外基质,与细胞外基质中某些组分发生反应。GDF15 前体可能通过这种机制,调控 GDF15 成熟蛋白在细胞外基质的

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81172460; 81302243)

作者简介:李博(1988-),男,博士研究生,研究方向:妇科肿瘤,电话:18591975272, E-mail: 592327264@qq.com

△通讯作者:辛晓燕(1952-),女,西京医院妇产科主任医师、教授、博士研究生导师,研究方向:妇科肿瘤及生殖内分泌研究,

E-mail:18591975272@163.com

(收稿日期:2014-04-04 接受日期:2014-04-28)

储存与释放,调控 GDF15 在外周血中的浓度,影响其生物学活性和细胞应答功能的发挥^[10,11]。许多细胞实验结果显示,在细胞被给予放化疗、炎症介质等应刺激后,其 GDF15 的表达会出现明显上升,且伴随诸多凋亡相关通路的激活(如 P53/P21, NF- κ B)^[11,12]。

在人体内 GDF15 的表达具有组织特异性,例如 GDF15 在胎盘和前列腺中呈高表达;在肾脏和胰腺中可检测到 GDF15 表达但水平不高;而在其他组织和器官中 GDF15 几乎不表达^[10]。人们发现在多种恶性肿瘤中均出现 GDF15 表达水平异常增高^[3-5]。同时还有研究显示,在结肠癌、前列腺癌、子宫内膜癌等多种肿瘤中血清 GDF15 浓度与肿瘤复发转移及不良预后有关^[6-8]。研究显示,GDF15 的促癌作用与以下三个机制密切相关:① GDF15 能激活 Akt 活性,促进 GSK-3 β 磷酸化,从而促进肿瘤细胞 DNA 增殖^[12];② 通过 ERK1/2 通路上调 UPA 系统增强肿瘤细胞的侵袭性^[13,14];③ 诱导 ErbB2 受体酪氨酸激酶在肿瘤细胞中过度表达,从而激活酪氨酸激酶活性参与恶性肿瘤的发生发展^[15]。本研究采用免疫组织化学技术对原发性卵巢癌手术切除标本和卵巢癌细胞株 A2780 和 CP70、SKOV3 和 SKOV3/DDP 中 GDF15 的表达状况进行研究,探讨 GDF15 与卵巢上皮性癌临床病理因素及铂类耐药的相关性。

1 材料与方法

1.1 资料

1.1.1 临床资料 在符合知情同意及校医学伦理委员会批准下,收集第四军医大学西京医院妇产科收治的初诊卵巢癌患者 80 例,按 3 个细胞学分级分类,每种级别的标本收集不少于 40 例。取卵巢癌转移组织标本作为配对标本。详细录入症状体征、病理类型、细胞学分级、FIGO 手术分期、淋巴结转移及腹水情况、血清 CA125 水平、术后治疗及随访等临床资料。以上病例的病理切片均由同一病理医师查看以复核诊断。

1.1.2 卵巢癌细胞系 卵巢癌顺铂敏感/耐药株 A2780 和 CP70、SKOV3 和 SKOV3/DDP 两对卵巢癌细胞株由第四军医大学西京医院妇产科实验室保存,以上细胞用含 10%胎牛血清和 1%青、链霉素双抗的 1640 培养基培养,并于 37℃ 恒温,5% CO₂,饱和湿度的细胞培养箱中传代培养。

1.2 主要试剂

GDF15 单克隆抗体(鼠抗人)购自美国 Sigma 公司, β -actin 多克隆抗体(兔抗人)、IgG-HRP 二抗(羊抗兔)、ECL 发光液均购自美国 Thermo 公司。免疫组化试剂盒(SP 法)、DAB 显色试剂盒、苏木精均购自北京中杉金桥生物技术公司。1640 培养基购自 Hyclone 公司,PVDF 膜购自 Millipore 公司;电泳仪为 Biorad 公司 PowerPac™ 通用电泳仪。

1.3 免疫组化染色

所有组织标本甲醛脱水固定、石蜡包被后,5 μ m 厚度切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,0.3%过氧化氢-甲醇溶液浸泡 30 min 以封闭内源性过氧化物酶,PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次,枸橼酸缓冲液 95℃ 微波抗原修复 15 min 后 PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,滴加正常山羊血清室温封闭 20 min,滴加一抗 4℃ 孵育过夜,PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,滴加二抗室温封闭 1h,PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,DAB 显色在显微镜下掌握染色程度。

PBS 或自来水冲洗,苏木精复染,盐酸酒精分化,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明后封片镜检。用 PBS 代替一抗作为阴性对照,用已知 GDF15 阳性的乳腺癌病理切片作为阳性对照。镜下所见棕黄色颗粒为免疫阳性信号。利用 Image-pro Plus5.1 图像分析系统,自动选取镜下阳性区域,计算 IOD 值(累积光密度值)。根据 IOD 值高低,划分 GDF15 表达强度(弱阳性、阳性和强阳性)。

1.4 实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测 GDF15 在卵巢癌细胞株中表达

对数生长期的卵巢癌细胞,提取总 RNA,反转录后得到 cDNA,作为反应模板。反转录条件见表 1,2。

表 1 反转录反应条件

Table 1 Reverse transcription steps

Temperature	Time
37℃	15min
85℃	5S
4℃	∞

表 2 反转录反应体系

Table 2 Reagents and volume for Reverse transcription

Reagents	Volume
5 $\times$ Primer Script Buffer	4 μ L
Primer Script TM RT	1 μ L
RNase Free dH ₂ O	11 μ L
Oligo dT Primer (50 μ M)	1 μ L
Random 6 mers (100 μ M)	1 μ L
Total RNA	2 μ L

查询 GeneBank 上已有的 GDF15 引物。GDF15 的引物序列为:5'-GACCCCTCAGAGTTGCACTCC-3' 和 5'-GCCTGGT-TAGCAGGTCCTC-3',内参照 β -actin 的引物序列为:5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3' 和 5'-CTGGAAGGTG-GACAGCGAGG-3'。以之前反转录获得的 cDNA 作为反应模板,按下列反应体系混合 20 μ L PCR 体系,加入 PCR 八联管中,在 Prism 7500 real time-PCR 仪 (ABI) 上进行反应。反应体系和反应条件见表 3,4。

表 3 qRT-PCR 反应体系

Table 3 reagents and volume for qRT-PCR

Reagents	Volume
SYBR Primix EX Taq™ II	10 μ L
PCR forward Primer	0.8 μ L
PCR reverse Primer	0.8 μ L
ROX reference Dye	0.4 μ L
template	2 μ L
ddH ₂ O	6 μ L

反应完成后,用 ABI Prism 7500 SDS 软件分析数据。

表 4 qRT-PCR 反应条件
Table 4 qRT-PCR steps

Stages	Temperature	Time	Reps
1	95℃	30s	1
2	95℃	5s	40
	60℃	34s	40

1.5 Western blot 检测 GDF15 在卵巢癌细胞株中表达

RIPA 细胞裂解液 100 μ L, 冰上放置 30 min 裂解细胞, 低温 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清即为蛋白样品。为确保蛋白上样量一致, 样品中蛋白经 BCA 法定量后, 加入 5 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸变性 5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。各取 250 μ g 蛋白样品行 SDS-PAGE 电泳, 100V 恒压湿转 1 h, 5% BSA 室温封闭 1 h, 加入兔抗人 GDF15 抗体(1:1000)和兔抗人 β -actin 抗体 (1:3000), 4 $^{\circ}$ C 孵育 16 h, 用 TBST 漂洗 10 min $\times$ 3 次, 加入 HRP 标记的抗兔二抗(1:3000), 室温孵育 1 h, 用 TBST 漂洗 5 min $\times$ 3 次; 加入 ECL 发光液(Thermo 公司), 常规压 X 片显影, 用灰度分析软件分析目的蛋白的丰度。

1.6 疗效评价

我们将卵巢癌患者分为两组: 铂类化疗敏感组和铂类化疗耐药组, 分组标准参照 GOG(美国妇科肿瘤学组)分型。卵巢癌铂类化疗敏感组: 初次采用基于铂类药物的联合化疗, 临床证实疾病缓解, 停药 6 个月以上出现复发灶。卵巢癌铂类化疗耐药组: 初次化疗有效, 但在完成化疗 6 个月内出现复发^[9]。

1.7 资料分析及统计学处理

采用 SPSS17.0 软件, 分组资料间比较采用 χ^2 检验, 等级资料间比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 差异为有统计学意义。

2 结果

2.1 GDF15 在卵巢癌组织中的表达

在卵巢上皮癌组织中 GDF15 均有表达, 主要为胞浆定位, 但染色强弱不等。对临床病理因素的分析表明, GDF15 的表达水平随着卵巢癌手术分期的进展也逐渐升高, 有统计学差异($X^2=15.86, P=0.015$)。此外, 卵巢癌组织中 GDF15 的表达强度与卵巢癌细胞分化程度、腹水及淋巴结转移显著有关($P < 0.001$)(表 5)。

2.2 卵巢癌 GDF15 表达与卵巢癌铂类药物化疗敏感性的关系

48 例铂类敏感组中 77.0% 为 GDF15 低表达, 高表达仅为 6.3%, 而 32 例耐药组中 GDF15 高表达者为 46.9%, 低表达者仅为 15.6%, GDF15 高表达在铂类耐药组中比例显著高于铂类敏感组, 两者差异有统计学意义($P < 0.01$)(表 2)。

2.3 实时定量 PCR (qRT-PCR)检测 GDF15 在卵巢癌细胞株中表达

我们用实时定量 PCR 检测了两对不同顺铂敏感性的卵巢癌细胞株 A2780 和 CP70、SKOV3 和 SKOV3/DDP 中 GDF15 mRNA 水平。结果显示 CP70 中 GDF15 mRNA 水平是 A2780 细胞的 9.09 倍, 而 SKOV3/DDP 中 GDF15 mRNA 水平是 SKOV3 细胞的 3.46 倍。卵巢癌顺铂耐药细胞中 GDF15 mRNA 水平显著升高提示 GDF15 的表达水平与卵巢癌顺铂耐药性

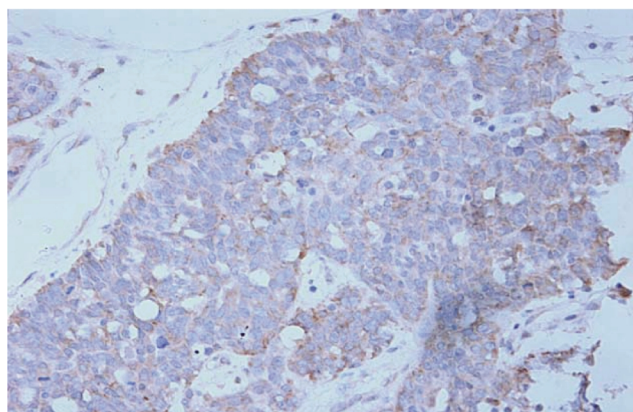


图 1 卵巢上皮性癌免疫组化染色($\times 400$)

Fig.1 Immunostaining of primary epithelial ovarian cancers($\times 400$)

*注: 卵巢上皮性癌中 GDF15 呈胞浆表达。

*Note: Representative of GDF15 immunostaining of primary epithelial ovarian cancers locate in the cytoplasm.

有关。

2.4 Western blot 检测卵巢癌细胞株中 GDF15 蛋白表达

为了进一步验证 GDF15 与卵巢癌细胞顺铂耐药的相关性, 我们用 20 μ M 顺铂分别处理卵巢癌 A2780 和 CP70 细胞, 分别在 24 h 和 48 h 收集细胞并提取蛋白, Western blot 检测顺铂处理对 GDF15 蛋白表达水平的影响。结果表明, 与顺铂敏感株 A2780 相比, 顺铂耐药株 CP70 中 GDF15 蛋白表达水平有显著增高。给予同样浓度的顺铂刺激后, A2780 和 CP70 细胞中 GDF15 蛋白表达水平随着顺铂作用时间增加而增强, 提示 GDF15 的表达水平可能参与了卵巢癌顺铂耐药的形成(图 3)。

3 讨论

作为一种常见的妇科肿瘤, 上皮性卵巢癌的死亡率在女性恶性肿瘤居第 5 位。由于卵巢癌早期大多无特异性临床表现, 许多患者初次就诊时已为进展期, 5 年生存率仅为 15%~30%^[9]。寻找卵巢癌发生发展的关键因子将为卵巢癌的早期发现、早期治疗提供理论依据, 具有重大临床意义。

众多相关研究表明, 内稳态失衡, 细胞应激, 炎症刺激或遗传突变, 往往导致 GDF-15 表达增强和其介导的信号通路的异常活化, 进而导致许多疾病发生的风险增加, 尤其是 GDF-15 表达水平的增高往往出现在进展期癌症中, 更具体地说, 在黑素瘤, 口腔鳞状细胞癌和胃癌, 结肠直肠癌, 胰腺癌, 前列腺癌, 乳腺癌和宫颈癌上皮癌中都发现了 GDF15 表达水平的增高^[11,14,16-21]。已观察到在许多癌症的侵袭进展期, 无论是在恶性组织中, 癌细胞中还是血浆中, 与正常人相比, 均能检测出 GDF15 表达水平和外分泌 GDF15 蛋白浓度的大幅上升^[14,16-21]。癌症患者血清中检出 GDF15 高水平表达往往预示着不良预后, 与患者的无进展生存期密切相关^[20,21]。本研究对 80 例卵巢上皮性癌病理组织进行免疫组化分析表明, 卵巢上皮癌 GDF15 表达主要呈胞浆表达, 且染色强弱不等。对临床病理因素的分析表明, GDF15 的表达水平随着卵巢癌手术分期的进展也逐渐升高, 有统计学差异($X^2=15.86, P=0.015$)。此外, 卵巢癌组织中 GDF15 的表达强度与卵巢癌细胞分化程度、腹水及

表 5 GDF15 表达水平与临床病理因素间的关系[n(%)]

Table 5 The relationship between GDF15 expression and clinical pathologic factors in primary epithelial ovarian cancers[n(%)]

Groups	Total(n)	High n (%)	Middle n (%)	Low n (%)
Pathological type				
Serous carcinoma	29	15(51.7)	6(20.7)	8(27.6)
Mucinous adenocarcinoma	28	17(60.7)	6(21.4)	5(17.9)
Endometrioid carcinoma	15	7(46.7)	4(33.3)	4(33.3)
The other type	8	4(50.0)	2(25.0)	2(25.0)
FIGO stage				
I	8	1(12.5)	2(25.0)	5(62.5)
II	12	1(8.3)	4(33.3)	7(58.3)
III	37	7(18.9)	14(43.2)	14(37.8)
IV	23	13(56.5)	6(26.1)	4(17.4)*
Differentiation Level				
High level	21	2(9.5)	10(47.6)	9(45.9)
Middle level	28	11(39.3)	7(25.0)	10(35.7)
Low level	31	14(45.2)	8(25.8)	9(29.0) #
Ascites				
None	26	11(42.3)	8(30.8)	7(26.9)
Yes	54	37(68.5)	7(13.0)	10(18.5) #
Lymph node metastasis				
None	23	4(22.6)	7(11.0)	12(16.4)
Yes	57	27(47.4)	13(22.8)	17(29.8)#

*P<0.05 ,#P<0.01.

* 注:Total:总例数;High:高表达例数 / 百分比;Middle:中表达例数 / 百分比;Low:低表达例数 / 百分比;FIGO stage:国际妇产科联盟手术病理分期。

*Note:Total:the total cases number;High:High expression cases number/%;Middle:Middle expression cases number/%;Low: Low expression cases number/%;FIGO stage:The federal of international Gynecology and Obstetrics surgical and pathology stage.

表 6 GDF15 表达与卵巢癌铂类药物化疗敏感性的关系[n(%)]

Table 6 The relationship between GDF15 expression and chemosensitivity in primary epithelial ovarian cancers. [n(%)]

Groups	High n (%)	Middle n (%)	Low n (%)
Sensitive	3(6.3)	8(16.7)	37(77.0)
Resistance	15(46.9)	12(37.5)	5(15.6)

* 注:Sensitive:敏感组;Resistance:耐药组;High:高表达例数 / 百分比;Middle:中表达例数 / 百分比;Low:低表达例数 / 百分比。

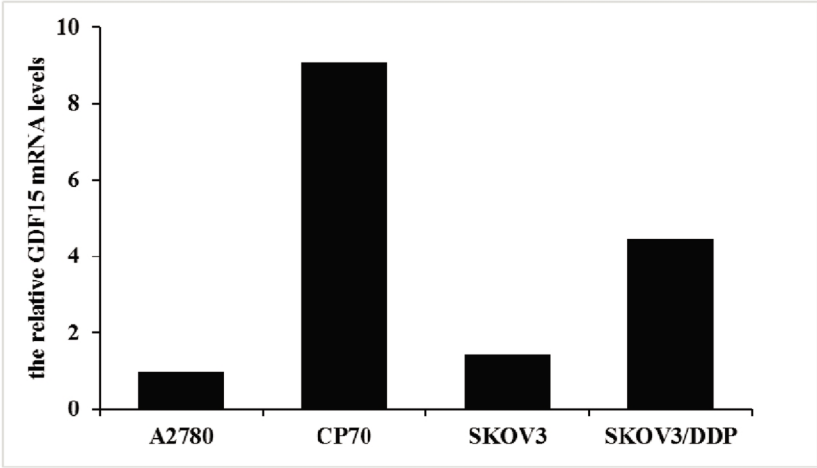


图 2 四种卵巢癌细胞株中 GDF15 mRNA 水平的比较

Fig.2 The relative GDF15 mRNA levels in four ovarian cancer cell lines

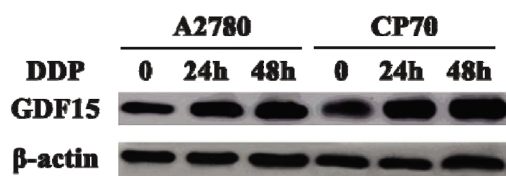


图3 Western blot 检测顺铂处理对卵巢癌细胞中 GDF15 蛋白表达水平的影响

Fig.3 The GDF15 expression in both A2780 and CP70 cell lines treated with cisplatin by western blot

淋巴结转移显著有关($P < 0.001$)。我们还发现,在铂类耐药组中,GDF15 高表达者的比例为 46.9%,大大高于铂类敏感组(6.3%),两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。上述结果提示 GDF15 表达强度不仅与卵巢癌发生发展相关,而且与卵巢癌铂类耐药相关,检测 GDF15 表达水平对前瞻性预测化疗药物敏感性和判断化疗疗效具有一定的临床指导价值。

在癌症进展中,通过改变某些基因的表达,癌细胞获得对放化疗的抵抗力。GDF15 的过表达被发现在多种类型的肿瘤细胞,如乳腺癌、前列腺癌、肺癌和结肠癌细胞中,表现为细胞保护作用以及获得性化疗药物耐药功能^[20,22-24]。有学者通过基因芯片,对比分析顺铂处理后的 NCI-H226 和 NCI-H2170 肺癌细胞基因表达情况变化,发现 GDF15 表达增强与顺铂耐药事件的发生存在正相关关系^[23]。对高危型局限性前列腺癌患者采用新辅助化疗方案的(包括米托蒽醌和多西紫杉醇)一项 II 期临床试验结果表明,GDF15 转录水平的提高往往伴随前列腺癌化疗耐受事件的发生,表明 GDF15 能诱导癌细胞产生获得性耐药^[22]。体外实验证实了这一点,上调 GDF-15 在前列腺癌细胞系 PC3 和 DU145 中的表达,或者向细胞培养基中加入外源性人重组 GDF15 蛋白,都起到增强细胞对米托蒽醌和多西紫杉醇的耐药能力的作用^[22]。用包括如奥沙利铂、5-氟尿嘧啶在内的常用一线化疗药物处理结肠癌细胞系,我们发现结肠癌细胞中 GDF15 mRNA 水平大幅增加^[25]。

由此看来,GDF15 的过表达促进癌细胞的增殖,侵袭,转移,与化疗药物耐药能力的获得存在某种关联。为了弄清楚 GDF15 表达水平与卵巢癌铂类耐药的发生是否存在关联,我们选取了两对不同顺铂敏感性的卵巢癌细胞株 A2780 和 CP70、SKOV3 和 SKOV3/DDP 作为研究对象,其中 A2780、SKOV3 为顺铂敏感细胞株,而 CP70、SKOV3/DDP 为长期诱导获得的卵巢癌顺铂耐药细胞株。我们用实时定量 PCR 检测了两对卵巢癌细胞中 GDF15 mRNA 水平。结果显示 CP70 中 GDF15 mRNA 水平是 A2780 细胞的 9.09 倍,而 SKOV3/DDP 中 GDF15 mRNA 水平是 SKOV3 细胞的 3.46 倍。这与临床资料的统计结果一致,提示 GDF15 表达水平与卵巢癌细胞对铂类药物的敏感性差异有关,GDF15 可能在卵巢癌铂类耐药机制的形成中发挥一定的作用。

此外,我们用 Western blot 检测顺铂不同处理时间对 GDF15 蛋白表达水平的影响。结果表明,与顺铂敏感株 A2780 相比,给予同样浓度的顺铂刺激后,顺铂耐药株 CP70 中 GDF15 蛋白表达水平出现明显上调,且 GDF15 蛋白表达水平随着顺铂作用时间增加而增强,提示 GDF15 的表达水平变化

可能参与了卵巢癌顺铂耐药的形成。

综上所述,我们的研究结果表明,GDF15 的表达水平不仅与卵巢上皮性癌发生发展相关,而且还参与了卵巢癌细胞化疗耐药的形成。GDF15 可能成为卵巢上皮性癌患者进行早期筛选、监测病情、预测预后的有效分子标志物。

参考文献(References)

- [1] Osada M, Park HL, Park MJ, et al. A p53-type response element in the GDF15 promoter confers high specificity for p53 activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(4): 913-918
- [2] Kim IY, Park SY, Yang Y., et al. Role of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 in docetaxel-induced cell death of human colorectal cancer cells with different p53 status[J]. Arch Pharm Res, 2011, 34(2): 323-330
- [3] Breit S.N, Johnen H, Cook AD, et al. The TGF-beta superfamily cytokine, MIC-1/GDF15: a pleiotropic cytokine with roles in inflammation, cancer and metabolism [J]. Growth Factors, 2011, 29 (5): 187-195
- [4] SONG, H., D. Yin, Z. Liu. GDF-15 promotes angiogenesis through modulating p53/HIF-1alpha signaling pathway in hypoxic human umbilical vein endothelial cells[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(4): 4017-4022
- [5] Zhong Y, Krisanapun C, Lee SH, et al. Molecular targets of apigenin in colorectal cancer cells: involvement of p21, NAG-1 and p53 [J]. Eur J Cancer, 2010, 46(18): 3365-3374
- [6] Brown D.A, Hance KW, Rogers CJ, et al. Serum macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15): a potential screening tool for the prevention of colon cancer? [J] Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012, 21(2): 337-346
- [7] Wallin U, Glimelius B, Jirstrom K, et al. Growth differentiation factor 15: a prognostic marker for recurrence in colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2011, 104(10): 1619-1627
- [8] Staff AC, Trovik J, Eriksson AG, et al. Elevated plasma growth differentiation factor-15 correlates with lymph node metastases and poor survival in endometrial cancer[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(14): 4825-4833
- [9] Pereira A, Pé rez-Medina T, Magrina JF, et al. The impact of pelvic retroperitoneal invasion and distant nodal metastases in epithelial ovarian cancer[J]. Surg Oncol, 2014, 23(1): 40-44
- [10] Wang X, Baek SJ, Eling TE, et al. The diverse roles of nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene (NAG-1/GDF15) in cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(5): 597-606
- [11] Bauskin AR, Brown DA, Junankar S, et al. The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome[J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2330-2336
- [12] Si Y, Liu X, Cheng M, et al. Growth differentiation factor 15 is induced by hepatitis C virus infection and regulates hepatocellular carcinoma-related genes[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19967
- [13] Yang H, Choi HJ, Park SH, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) and subsequent urokinase-type plasminogen activator mediate cell death responses by ribotoxic anisomycin in HCT-116 colon cancer cells[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78(9): 1205-1213
- [14] Lee DH, Yang Y, Lee SJ, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the

- urokinase-type plasminogen activator system [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15): 4648-4655
- [15] Kim KK, Lee JJ, Yang Y, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(4): 704-712
- [16] Chen SJ, Karan D, Johansson SL, et al. Prostate-derived factor as a paracrine and autocrine factor for the proliferation of androgen receptor-positive human prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2007, 67: 557-571
- [17] Zhang L, Yang X, Pan HY, et al. Expression of growth differentiation factor 15 is positively correlated with histopathological malignant grade and in vitro cell proliferation in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2009, 45: 627-632
- [18] Wollmann W, Goodman ML, Bhat-Nakshatri P, et al. The macrophage inhibitory cytokine integrates AKT/PKB and MAP kinase signaling pathways in breast cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26: 900-907
- [19] Karan D, Chen SJ, Johansson SL, et al. Dysregulated expression of MIC-1/PDF in human prostate tumor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305: 598-604
- [20] Zhao L, Lee BY, Brown DA, et al. Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling[J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 7696-7703
- [21] Brown DA, Breit SN, Buring J, et al. Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: A nested case-control study[J]. *Lancet*, 2002, 359: 2159-2163
- [22] Huang CY, Beer TM, Higano CS, et al. Molecular alterations in prostate carcinomas that associate with in vivo exposure to chemotherapy: Identification of a cytoprotective mechanism involving growth differentiation factor 15 [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 5825-5833
- [23] Whiteside MA, Chen DT, Desmond RA, et al. A novel time-course cDNA microarray analysis method identifies genes associated with the development of cisplatin resistance[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 744-752
- [24] Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: A new model for anti-estrogen resistance[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:9817-9824
- [25] Proutski I, Stevenson L, Allen WL, et al. Prostate-derived factor-A novel inhibitor of drug-induced cell death in colon cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8: 2566-2574

(上接第 5636 页)

- [15] Eefsen M, Jelles P, Schmidt LE, et al. Brain expression of the water channels aquaporin-1 and -4 in mice with acute liver injury, hyperammonemia and brain edema[J]. *Metab Brain Dis*, 2010, 25(3): 315-323
- [16] Belanger M, Desjardins P, Chatauret N, et al. Selectively increased expression of the astrocytic/endothelial glucose transporter protein GLUT1 in acute liver failure[J]. *Glia*, 2006, 53(5): 557-562
- [17] Zwingmann C, Desjardins P, Hazell A, et al. Reduced expression of astrocytic glycine transporter(Glyt-1) in acute liver failure[J]. *Metab Brain Dis*, 2002, 17(4): 263-273
- [18] Rai V, Nath K, Sarawat VA, et al. Measurement of cytotoxic and interstitial components of cerebral edema in acute hepatic failure by diffusion tensor imaging[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2008, 28(2): 334-341
- [19] Spahr L, Butterworth RF, Fontaine S, et al. Increased blood manganese in cirrhotic patients relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms [J]. *Hepatology*, 1996, 24(5): 1116-1120
- [20] Rovira A, Cordoba J, Raguer N, et al. Magnetic resonance imaging measurement of brain edema in patients with liver disease: resolution after transplantation[J]. *Curr Opin Neurol*, 2002, 15(6): 731-737