

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.02.016

慢病毒介导生长分化因子 15 基因沉默增强胶质瘤 U373 细胞的化疗耐药性

张欢¹, 郭谦¹, 胡宇千², 曹蕾¹, 盖克克¹, 强兆艳¹(1. 天津医科大学基础医学院药理学教研室, 天津 300070; 2. 天津市第四中心医院药剂科, 天津 300070)

[摘要] **目的:** 探讨慢病毒介导的生长分化因子 15 (growth differentiation factor 15, *GDF15*) 基因低表达对胶质瘤 U373 细胞对化疗药物替尼泊苷 (teniposide, VM-26) 和顺铂 (cisplatin, DDP) 耐药性的影响及其可能的机制。 **方法:** 将靶向 *GDF15* 的 *GDF15*-RNAi 克隆入慢病毒载体 GV248, 构建 shRNA 慢病毒 LV-*GDF15*-RNAi, 用无关序列构建阴性对照慢病毒 LV-RNAi, 分别稳定转染 U373 细胞, Western blotting 检测转染对细胞内 *GDF15* 表达的影响。用梯度质量浓度的 VM-26 (0.1、0.5、2.5 和 12.5 $\mu\text{g/ml}$) 和 DDP (0.08、0.4、2 和 10 $\mu\text{g/ml}$) 处理 LV-*GDF15*-RNAi 组和 LV-RNAi 组细胞 48 h, MTT 法、Hoechst/PI 双染检测 LV-*GDF15*-RNAi 转染对 U373 细胞 VM-26、DDP 耐药性的影响, Western blotting 检测 LV-*GDF15*-RNAi 转染对 U373 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bcl-xL、P53 和 Caspase-3 表达的影响。 **结果:** 成功构建稳定低表达 *GDF15* 的 U373 细胞系, LV-*GDF15*-RNAi 组细胞内 *GDF15* 表达较 LV-RNAi 组和野生型 U373 细胞显著降低 (0.013 ± 0.001 vs 0.622 ± 0.068 、 0.601 ± 0.004 , 均 $P < 0.01$)。VM-26 和 DDP 在最低浓度时, LV-*GDF15*-RNAi 组细胞存活率即显著高于 LV-RNAi 组 [VM-26 0.1 $\mu\text{g/ml}$: (91.84 ± 2.64)% vs (80.71 ± 2.66)%, $P < 0.01$; DDP 0.08 $\mu\text{g/ml}$: (102.35 ± 6.79)% vs (85.10 ± 3.69)%, $P < 0.01$], 随药物浓度升高差异更加显著。相同浓度的 VM-26 或 DDP 处理下, LV-*GDF15*-RNAi 组细胞凋亡数均少于 LV-RNAi 组; 同时, LV-*GDF15*-RNAi 组的 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达量比 LV-RNAi 组显著增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Caspase-3 和 P53 的表达量显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论:** 下调胶质瘤 U373 细胞中 *GDF15* 水平能够增强细胞对 VM-26 和 DDP 的耐药性, 其机制可能与 *GDF15* 调控 Bcl-2、Bcl-xL、P53 和 Caspase-3 的表达有关。

[关键词] 胶质瘤; 生长分化因子 15 基因; 慢病毒; 耐药性

[中图分类号] R739.41; R737.9; R730.53

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)02-0230-06

Lentivirus mediated silencing of the growth differentiation factor 15 gene increases chemotherapy resistance of glioma U373 cells

Zhang Huan¹, Guo Qian¹, Hu Yuqian², Cao Lei¹, Gai Keke¹, Qiang Zhaoyan¹(1. Department of Pharmacology, College of Basic Medical, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Pharmacy, The Fourth Center Hospital of Tianjin, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the effect of the growth differentiation factor 15 (*GDF15*) gene in resistance of glioma cells to chemotherapeutic agents cisplatin (DDP) and teniposide (Vumon, VM-26) *in vitro*. **Methods:** Glioma U373 cells were infected with a lentiviral vector expressing a small hairpin RNA targeting the *GDF15* gene (LV-*GDF15*-RNAi) and a control lentiviral vector (LV-RNAi), respectively. Stably infected cells were then treated with VM-26 (0.1, 0.5, 2.5 and 12.5 $\mu\text{g/ml}$) and DDP (0.08, 0.4, 2 and 10 $\mu\text{g/ml}$). After treatment for 48 h, cell viability was assessed by MTT assay and Hoechst/PI staining to evaluate differences in resistance to VM-26 and DDP, and changes in Bcl-2, Bcl-xL, P53 and caspase-3 proteins were analyzed by Western blotting. **Results:** *GDF15* protein content was significantly lower in LV-*GDF15*-RNAi-infected U373 cells (0.013 ± 0.001) than in LV-RNAi-infected (0.622 ± 0.068)

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (No. 30701030), 天津市应用基础及前沿技术研究计划资助 (No. 11JCYBJC14900), 国家高技术研究发展 (863 计划) 计划资助项目 (No. 2012AA021003)。Project supported by the Youth Foundation of the National Natural Science Foundation of China (No. 30701030), the Project of Research Foundation in Application and Frontier Technology of Tianjin City (No. 11JCYBJC14900), and the National High Technology Research and Development Program (863 Program) of China (No. 2012AA021003)

[作者简介] 张欢 (1990 -), 女, 河北秦皇岛市人, 硕士, 主要从事肿瘤化疗耐药相关基因的研究, Email: tjykyzh@163.com。

[通信作者] 强兆艳 (Qiang Zhaoyan, corresponding author), E-mail: qzyss@sina.com

and wild-type U373 cells (0.601 ± 0.004) ($P < 0.01$); survival rate was significantly different between LV-GDF15-RNAi-infected (91.84 ± 2.64)% and LV-RNAi-infected (80.71 ± 2.66)% in the presence of VM-26 and DDP at the lowest concentrations used ($P < 0.01$) and the difference became more significant as the concentrations were increasing. Under the treatment with VM-26 or DDP at the same concentration, the number of apoptotic cells was significantly lower in LV-GDF15-RNAi-infected cells than that in LV-RNAi-infected cells ($P < 0.05$). In association with changes in apoptosis, protein levels of Bcl-2 and Bcl-xL were significantly higher ($P < 0.05$) but protein levels of P53 and caspase-3 were significantly lower ($P < 0.01$) in LV-GDF15-RNAi-infected cells than in LV-RNAi-infected cells. **Conclusion:** Down-regulation of the *GDF15* gene may increase the resistance of glioma cells to VM-26 and DDP, possibly through regulating the expression of Bcl-2, Bcl-xL, P53 and caspase-3.

[**Keywords**] glioma; growth differentiation factor 15 (*GDF15*) gene; lentivirus; drug resistance

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(2): 230-235]

生长分化因子 15 (growth differentiation factor 15, GDF15) 是转化生长因子- β (TGF- β) 超家族中的一个分支, 在正常的胎盘、前列腺、肾脏和胰脏组织中均有表达, 其他组织或器官中表达量很低或几乎不表达^[1]。大多数的癌症组织中 GDF15 表达水平很高^[2-3], 并有研究证实 GDF15 具有抑制肿瘤生长与转移, 促进肿瘤细胞凋亡的作用^[4]。脑胶质瘤是脑内最常见的原发性肿瘤, 其发病率高、侵袭性强、病死率高, 化疗是脑胶质瘤主要治疗手段之一, 但大多数脑胶质瘤存在不同程度的化疗抵抗, 严重影响了化疗的疗效^[5]。本研究旨在探索 GDF15 基因表达水平与化疗敏感相关性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

人体胶质瘤细胞系 U373 购自中国医学科学院肿瘤细胞库、 α -MEM 培养基、胎牛血清均购自 Hyclone 公司。二甲基噻唑二苯基四唑溴盐 (MTT) 购自 Ameresco 公司, Hoechst33258 试剂盒购自南京建成生物科技发展有限公司, β -actin 一抗购自碧云天生物技术有限公司, GDF-15、Bcl-2、p53、Caspase-3 一抗均购自美国 Santa Cruz 公司。替尼泊苷 (teniposide, VM-26) 注射液购自北京双鹤制药公司 (批号: 20111210), 顺铂 (cisplatin, DDP) 注射液 (批号: 20110901) 购自云南生物谷灯盏花药业公司。

1.2 靶向干扰 *GDF15* 的 shRNA 慢病毒的构建

根据人源 *GDF15* mRNA 序列 (Gene Bank NM_004864.2), 设计 *GDF15* 的 RNAi 序列, 合成寡核苷酸双链, 正义序列: 5'-CCGGCCGGATACTCACGC-CAGAAGTCTCGAGACTTCTGGCGTGAGTATCCGGTTTTC-3', 反义序列: 5'-AATTCAAAAACCGGATACT-CACGCCAGAAGTCTCGAGACTTCTGGCGTGAGTAT-

CCGG-3'。将 GDF15-RNAi 克隆入慢病毒载体 GV248, 构建 shRNA 慢病毒 LV-GDF15-RNAi。用无关序列构建阴性对照慢病毒 LV-RNAi。

1.3 LV-GDF15-RNAi 稳定转染 U373 细胞系

用含有 10% 胎牛血清的 α -MEM 完全培养基于 37 °C 孵箱中培养 U373 细胞, 用无血清培养基稀释病毒液, LV-GDF15-RNAi 和 LV-RNAi 分别按 MOI = 20 转染 U373 细胞。24 h 后更换完全培养基, 48、96 h 时在荧光显微镜下观察荧光表达情况, 检测转染效率。

接着以嘌呤霉素梯度浓度筛选稳定表达细胞系, 同时用相同浓度梯度的嘌呤霉素筛选未转染过的正常 U373 细胞, 最终得到稳定转染细胞系。

1.4 Western blotting 检测 LV-GDF15-RNAi 转染对 U373 细胞 GDF15 蛋白表达的影响

裂解 LV-GDF15-RNAi 组和 LV-RNAi 组稳定转染的细胞及正常未转染的对照组 U373 细胞, 分别提取总蛋白并检测蛋白浓度。按每孔 30 μ g 上样量, 行 15% SDS-PAGE, 4 °C 转膜 2 h, 室温封闭 2 h, 4 °C 孵育 GDF-15 一抗过夜, 洗膜, 用相应二抗室温孵育 2 h, 洗膜, 将 ECL 发光液均匀滴在膜上, 显色 2 min 后曝光。

1.5 MTT 法检测 GDF15 低表达对 U373 细胞耐药性的影响

对数期的 LV-GDF15-RNAi 组和 LV-RNAi 组细胞各 100 μ l 分别接种 96 孔板, 密度 7×10^3 个/孔。24 h 后更换完全培养基, 按处理药物分为 VM-26 组 (0.1、0.5、2.5 和 12.5 μ g/ml)、DDP 组 (0.08、0.4、2 和 10 μ g/ml) 和不加药处理的空白对照组, 各设 6 个复孔。

各组细胞置 37 °C 培养 48 h, 每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μ l, 继续培养 4 h, 小心吸除上清, 每孔加入 200 μ l 的 DMSO 溶液, 置酶标仪中震荡 5 min, 读取

570 nm 波长处光密度(*D*)值,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(实验组平均*D*值-空白对照组*D*值)/(对照组平均*D*值-空白对照组*D*值)×100%。

1.6 Hoechst 33258 和 PI 双染检测 GDF15 低表达对 U373 细胞凋亡的影响

将 LV-GDF15-RNAi 组和 LV-RNAi 组细胞各 500 μl 分别接种于 24 孔板,密度为 4 × 10⁴ 个/孔,分别加入梯度浓度的 VM-26 和 DDP(同 MTT 法),48 h 后洗细胞 2 次,每孔加入 100 μl Hoechst 33258 染料(5 μg/ml),37 °C 避光孵育 15 min,每孔加入 100 μl PI 染料,4 °C 避光染色 10 min。荧光显微镜下观察细胞荧光。

1.7 Western blotting 检测 GDF15 低表达对 U373 细胞内 Bcl-2、Bcl-xL、Caspase-3 及 P53 蛋白表达的影响

取对数期的 LV-GDF15-RNAi 组和 LV-RNAi 组细胞各 2 ml 接种于 6 孔板,细胞数为 2 × 10⁵ 个/孔,分别用梯度浓度(同 MTT 法)的 VM-26 和 DDP 对细胞处理 48 h,提取总蛋白并检测蛋白浓度。使用 Bcl-2、Bcl-xL、Caspase-3 及 P53 一抗及相应二抗进行 Western blotting 检测,方法同 1.4。

1.8 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析及 *t* 检验,以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建的 LV-GDF15-RNAi 和 LV-RNAi 稳定转染 U373 细胞系

荧光显微镜观察结果(图 1)显示,转染 96 h 后荧光达到最亮,转染效率大于 90%,慢病毒转染成功。嘌呤霉素筛选 72~96 h 后,LV-GDF15-RNAi 组和 LV-RNAi 组细胞在嘌呤霉素浓度不大于 4 μg/ml 时存活,而未经转染的正常 U373 细胞无存活,说明成功筛选出 LV-GDF15-RNAi 和 LV-RNAi 稳定转染细胞。

2.2 LV-GDF15-RNAi 转染抑制 U373 细胞中 GDF15 蛋白的表达

Western blotting 检测结果(图 2)显示, LV-GDF15-RNAi 组 U373 细胞内 GDF15 表达量较 LV-RNAi 组和对照组显著降低(0.013 ± 0.001 vs 0.622 ± 0.068、0.601 ± 0.004,均 *P* < 0.01)。且 LV-RNAi 组和对照组 GDF15 的表达差异无统计学意义

(*P* > 0.05)。

2.3 GDF15 低表达提高 U373 细胞对 VM-26 和 DDP 的耐药性

MTT 检测结果(图 3)显示, LV-GDF15-RNAi 组和 LV-RNAi 组细胞用不同浓度的 VM-26 和 DDP 处理,药物浓度越高细胞存活率越低。而在 VM-26 和 DDP 药物浓度相同情况下, LV-GDF15-RNAi 组比 LV-RNAi 组细胞存活率显著升高。VM-26 和 DDP 在最低浓度时, LV-GDF15-RNAi 组细胞存活率即显著高于 LV-RNAi[VM-26 0.1 μg/ml:(91.84 ± 2.64)% vs (80.71 ± 2.66)%, *P* < 0.01; DDP 0.08 μg/ml:(102.35 ± 6.79)% vs (85.10 ± 3.69)%, *P* < 0.01]。结果说明, GDF15 表达下调提高了 U373 细胞对该两药的耐药性。

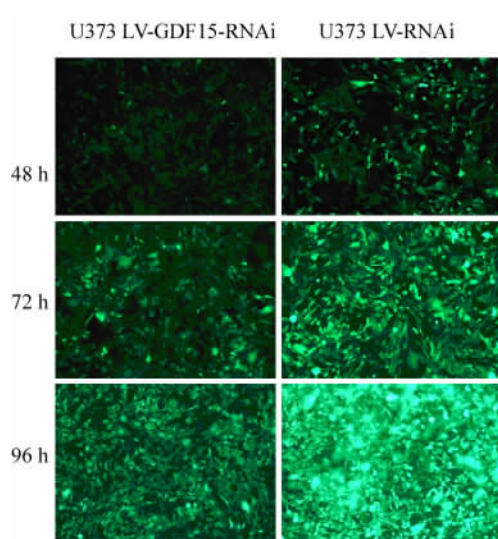


图 1 LV-GDF15-RNAi 和 LV-RNAi 转染 U373 细胞绿色荧光蛋白表达情况(×100)

Fig.1 Expression of GFP in U373 cells transfected with LV-GDF15-RNAi and LV-RNAi (×100)

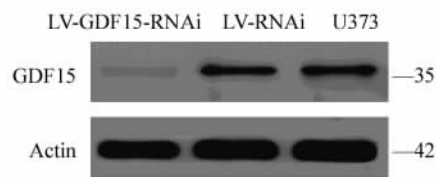


图 2 LV-GDF15-RNAi 转染 U373 细胞下调 GDF15 蛋白表达

Fig.2 GDF15 expression in U373 cells were inhibited by LV-GDF15-RNAi transfection

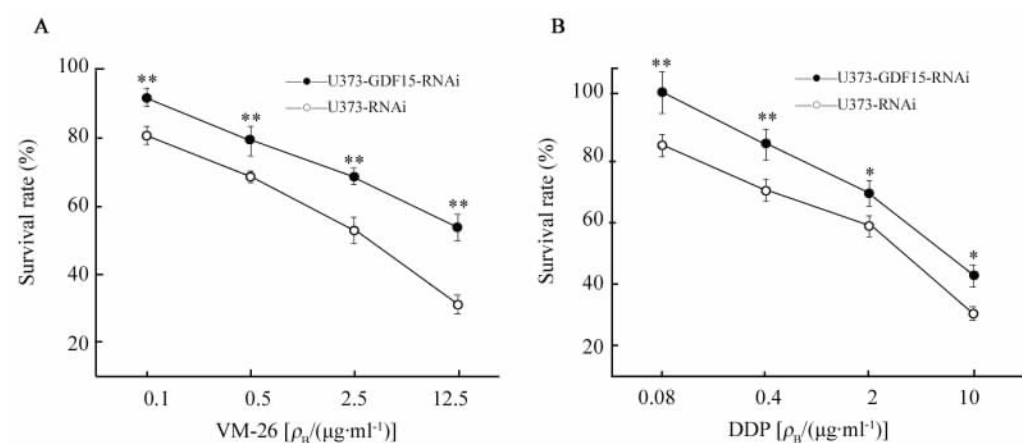


图3 GDF15低表达提高U373细胞对VM-26和DDP的耐药性

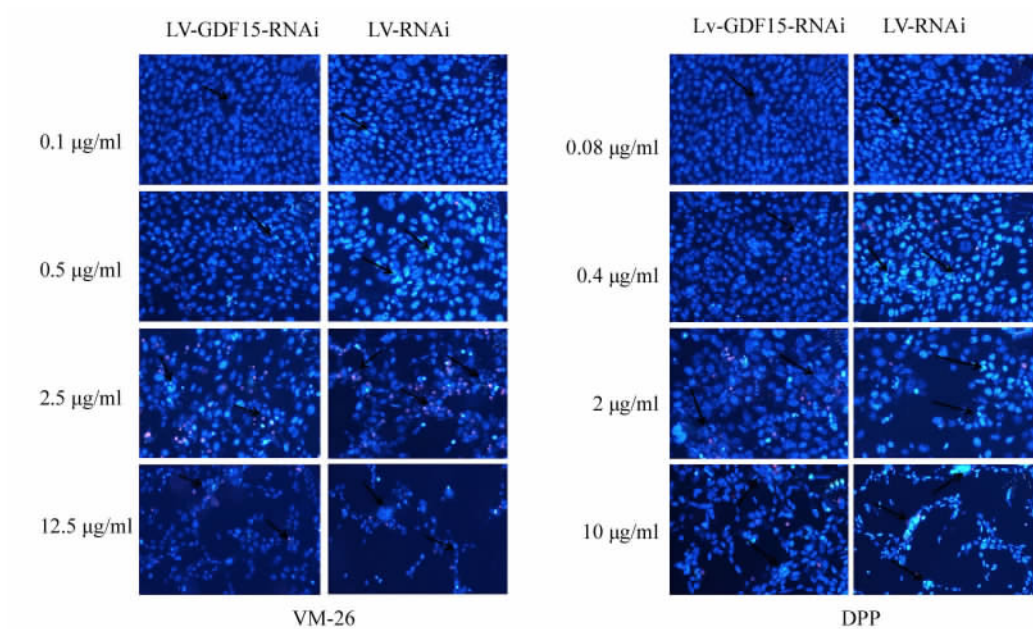
Fig. 3 Downregulation of GDF15 increased the resistance to VM-26 and DDP of U373 cells

A: Treated with VM-26; B: Treated with DDP * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs U373 LV-RNAi

2.4 GDF15低表达抑制VM-26和DDP对U373细胞的促凋亡作用

Hoechst 33258和PI双染结果(图4)显示,未凋亡细胞形态完整,能均匀着色,呈暗蓝色;凋亡细胞的细胞核固缩凝聚,呈亮蓝色,死亡细胞被PI染色

呈红色。随着VM-26和DDP浓度升高,凋亡及死亡细胞越来越多。图像中箭头指示为出现细胞核固缩凝聚现象的典型凋亡细胞,可以看出,同种抗癌药物相同浓度作用下,LV-GDF15-RNAi组凋亡细胞所占比例明显小于LV-RNAi组凋亡细胞所占比例。

图4 GDF15低表达抑制VM-26和DPP诱导的U373细胞凋亡($\times 100$)Fig. 4 Inhibition of GDF15 low expression on the apoptosis of U373 cells induced by VM-26 and DPP($\times 100$)

2.5 GDF15低表达影响U373细胞Bcl-2、Bcl-xL、Caspase-3及P53蛋白表达

Western blotting检测结果(图5,表1)显示,随

着VM-26和DDP给药浓度增加,各组细胞内抗癌蛋白Bcl-2和Bcl-xL的表达水平均显著下降,凋亡执行蛋白Caspase-3和P53表达量明显增多。但在相

同浓度的 VM-26 或 DDP 处理下, LV-GDF15-RNAi 组的 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达量比 LV-RNAi 组明显增多, Caspase-3 和 P53 的表达量显著下降。

3 讨论

GDF-15 作为一种应激蛋白, 有复杂的表达调节机制, 在剧烈刺激、炎症、癌症等各种应激状态下, GDF15 会大量表达^[6]。目前, 研究^[7-11]证实, GDF15 能保护心血管、抗心肌细胞凋亡, 并且 GDF15 能调控肿瘤的生长、抑制肿瘤细胞转移和促进肿瘤细胞凋亡, 可以认为 GDF15 是一种肿瘤抑制基因^[12-13]。并有越来越多的研究^[14-15]证明, GDF15 具有肿瘤生物标志物的特征。研究^[16]发现, 高表达 GDF15 的转基因小鼠有可能通过 p38 MAPK 信号通路抑制乌拉坦所致的肺癌的发展, 促使肿瘤细胞凋亡。Shimizu 等^[17]发现, GDF15 在其过表达的转基因小鼠中经 P38 MAPK 通路作用于 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶-1 (N-acetyl-β-D-glucosaminidase-1, NAG-1), 抑制肠癌和前列腺癌发展。Kadowaki 等^[18]指出, -53 和 +55 CpG 位点的甲基化作用会引起 NAG-1 的沉默, 最终促进肿瘤细胞增殖。有研究^[19]通过敲低卵巢细胞 GDF15 的水平发现, GDF15 可以

通过 p27 蛋白产生卡铂耐药性, 从而抑制卵巢癌细胞的生长。

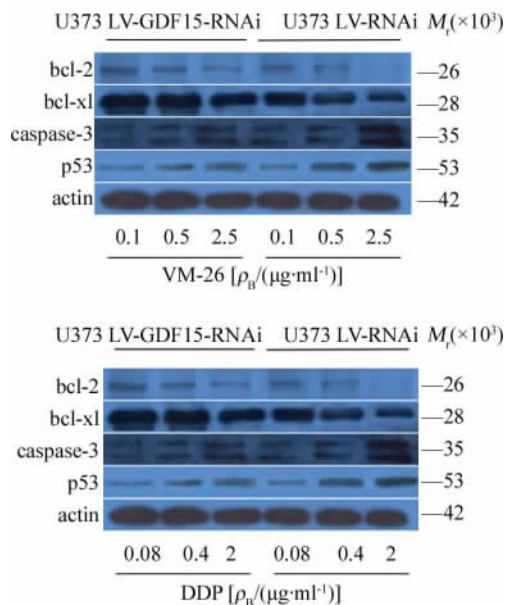


图 5 GDF15 低表达对 U373 细胞内 Bcl-2、Bcl-xL、Caspase-3 及 P53 表达的影响

Fig. 5 Effect of GDF 15 low expression on the expression of Bcl-2, Bcl-xL, Caspase-3 and P53 in U373 cells

表 1 GDF15 低表达对 U373 细胞内 Bcl-2、Bcl-xL、Caspase-3 及 P53 表达的影响

Tab. 1 Effect of GDF 15 low expression on the expression of Bcl-2, Bcl-xL, Caspase-3 and P53 in U373 cells

Related proteins	VM-26 [ρ _B /(μg · ml ⁻¹)]			DDP [ρ _B /(μg · ml ⁻¹)]		
	0.1	0.1	0.5	0.08	0.4	2
Bcl-2						
LV-GDF15-RNAi	0.73 ± 0.02**	0.69 ± 0.02**	0.65 ± 0.03**	0.81 ± 0.01**	0.72 ± 0.01**	0.57 ± 0.02**
LV-RNAi	0.68 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.51 ± 0.02	0.75 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.45 ± 0.02
Bcl-xL						
LV-GDF15-RNAi	0.81 ± 0.03**	0.73 ± 0.03**	0.65 ± 0.02**	0.96 ± 0.02*	0.91 ± 0.02**	0.84 ± 0.01**
LV-RNAi	0.68 ± 0.03	0.62 ± 0.04	0.47 ± 0.04	0.89 ± 0.02	0.83 ± 0.03	0.71 ± 0.04
Caspase-3						
LV-GDF15-RNAi	0.57 ± 0.03*	0.64 ± 0.02**	0.69 ± 0.02**	0.64 ± 0.03**	0.71 ± 0.03**	0.77 ± 0.02**
LV-RNAi	0.66 ± 0.03	0.71 ± 0.02	0.76 ± 0.03	0.73 ± 0.02	0.78 ± 0.02	0.86 ± 0.03
P53						
LV-GDF15-RNAi	0.59 ± 0.02*	0.64 ± 0.02**	0.68 ± 0.02**	0.55 ± 0.03*	0.63 ± 0.04**	0.69 ± 0.04**
LV-RNAi	0.63 ± 0.02	0.69 ± 0.02	0.74 ± 0.02	0.62 ± 0.04	0.73 ± 0.03	0.79 ± 0.02

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs LV-RNAi group

VM-26 作为拓扑异构酶 II 抑制剂, 通过引起瞬间双链酶桥的断裂, 然后打通和再封闭, 以改变 DNA 的拓扑状态, 阻止肿瘤细胞 DNA 的复制过

程^[20]。DDP 属于细胞非特异性药物, 通过与 DNA 分子形成链内或链间交叉联接或阻止 RNA 分子再复制等途径发挥肿瘤抑制作用^[21-22]。VM-26 和

DDP 经过不同的作用机制,均可导致肿瘤细胞 DNA 损伤,激活细胞内部线粒体凋亡途径,引起肿瘤细胞凋亡。降低细胞内 GDF15 的表达能减轻 VM-26 和 DDP 对 U373 细胞的损伤作用,推测 GDF15 的低表达有可能促进了 DNA 修复。

本研究发现,GDF15 低表达细胞的抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达量均明显增多,而抑癌基因 P53 的蛋白表达量和凋亡调控因子 Caspase-3 的蛋白表达量明显减少。VM-26 和 DDP 能够活化 P53 蛋白,促进 Bcl-2 和 Bcl-xl 发挥抗凋亡作用,而凋亡执行分子 Caspase-3 最终诱导细胞凋亡。由此推测,GDF15 低表达其可能通过 P53、Caspase-3 途径影响细胞凋亡过程,增强肿瘤细胞耐药性。

综上所述,下调 GDF15 表达水平能降低 U373 细胞对 VM-26 和 DDP 的敏感性,提高 U373 细胞的耐药性,GDF15 是胶质瘤的潜在生物治疗靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10 (5): 459-466.
- [2] Monteiro-Reis S, Leca L, Almeida M, et al. Accurate detection of upper tract urothelial carcinoma in tissue and urine by means of quantitative GDF15, TMEFF2 and VIM promoter methylation [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(1): 226-233.
- [3] Trovik J, Salvesen HB, Cuppens T, et al. Growth differentiation factor-15 as biomarker in uterine sarcomas [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2014, 24(2): 252-259.
- [4] Scrideli CA, Carlotti Jr CG, Okamoto OK, et al. Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: Identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR [J]. *J Neurooncol*, 2008, 88(3): 281-291.
- [5] Shnaper S, Desbaillets I, Brown DA, et al. Elevated levels of MIC-1/GDF15 in the cerebrospinal fluid of patients are associated with glioblastoma and worse outcome [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(11): 2624-2630.
- [6] Kadowaki M, Yoshioka H, Kamitani H, et al. DNA methylation-mediated silencing of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1/GDF15) in glioma cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(2): 267-277.
- [7] Kempf T, Sinning JM, Quint A, et al. Growth-differentiation factor-15 for risk stratification in patients with stable and unstable coronary heart disease: Results from the AtheroGene study [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009, 2(3): 286-292.
- [8] Eggers KM, Kempf T, Allhoff T, et al. Growth-differentiation factor-15 for early risk stratification in patients with acute chest pain [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(19): 2327-2335.
- [9] Kempf T, Björklund E, Olofsson S, et al. Growth-differentiation factor-15 improves risk stratification in ST-segment elevation myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2007, 28(23): 2858-2865.
- [10] Kempf T, Eden M, Strelau J, et al. The transforming growth factor-super family member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury [J]. *Circ Res*, 2006, 98(3): 351-360.
- [11] Ago T, Sadoshima J. GDF15, a cardioprotective TGF- β superfamily protein [J]. *Circ Res*, 2006, 98(3): 294-297.
- [12] Tan M, Wang Y, Guan K, et al. PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(1): 109-114.
- [13] Baek SJ, Okazaki R, Lee SH, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia [J]. *Gastroenterology*, 2006, 131 (5): 1553-1560.
- [14] Kaur S, Chakraborty S, Baine MJ, et al. Potentials of plasma NGAL and MIC-1 as biomarker (s) in the diagnosis of lethal pancreatic cancer [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e55171.
- [15] Wang X, Li Y, Tian H, et al. Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1/GDF15) as a novel diagnostic serum biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma [J/OL]. *BMC cancer*, 2014, 14(1): 578. [2014-08-10]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/578>.
- [16] Cekanova M, Lee SH, Donnell RL, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 expression inhibits urethane-induced pulmonary tumorigenesis in transgenic mice [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2009, 2(5): 450-458.
- [17] Shimizu S, Kadowaki M, Yoshioka H, et al. Proteasome inhibitor MG132 induces NAG-1/GDF15 expression through the p38 MAPK pathway in glioblastoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(4): 1277-1282.
- [18] Kadowaki M, Yoshioka H, Kamitani H, et al. DNA methylation-mediated silencing of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1/GDF15) in glioma cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(2): 267-277.
- [19] Meier JC, Haendler B, Seidel H, et al. Knockdown of platinum-induced growth differentiation factor 15 abrogates p27-mediated tumor growth delay in the chemoresistant ovarian cancer model A2780cis [J]. *Cancer Med*, 2015, 4(2): 253-267.
- [20] 徐荣, 华咏, 钟平, 等. 替尼泊苷诱导脑胶质瘤细胞凋亡的检测指标评估 [J]. *中国临床神经科学*, 2010, 18(2): 156-160.
- [21] 李征宇, 赵霞, 杨金亮, 等. 顺铂作用卵巢癌细胞株的蛋白质组学研究 [J]. *中国科学: C 辑*, 2005, 35(3): 254-261.
- [22] Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis [J]. *Science*, 2000, 288(5468): 1053-1058.

[收稿日期] 2014 - 10 - 28

[修回日期] 2015 - 02 - 26

[本文编辑] 黄静怡