

综述

生长分化因子-15在神经系统、心血管疾病以及癌症进程中的作用

刘冬冬, 梅岩艾*

复旦大学生命科学学院, 上海 200433

摘要: 生长分化因子-15 (growth differentiation factor-15, GDF-15) 是转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β) 超家族中的一员。GDF-15的表达量通常会随着脑组织损伤、癌症、心血管疾病以及炎症反应等组织病理性损伤而有显著的升高, 使其成为一个潜在的疾病生物标志蛋白。近期有研究表明GDF-15在神经系统中具有一定的神经营养作用, 而最新研究揭示GDF-15具有调制神经元离子通道的表达、影响突触传递功能的作用。在癌症以及心血管系统中, GDF-15也参与了多种复杂的调控机制。本文对GDF-15的表达调控、作用机制以及主要的病理生理学作用进行介绍, 探讨GDF-15的生物活性以及其在基础研究和临床应用中的价值。

关键词: 生长分化因子-15; 信号通路; 神经系统; 癌症; 心血管系统

中图分类号: Q426; R363

Effects of growth differentiation factor-15 (GDF-15) on neurological systems, cardiovascular diseases, and cancer progression

LIU Dong-Dong, MEI Yan-Ai*

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Growth differentiation factor-15 (GDF-15) is a member of the transforming growth factor beta superfamily. GDF-15 expression is dramatically upregulated during acute brain injury, cancer, cardiovascular disease, and inflammation, suggesting its potential value as a disease biomarker. It has been suggested that GDF-15 has neurotropic effects in the nervous system. Our studies showed that GDF-15 modulated the expression of neuronal K^+ and Ca^{2+} ion channels and increased the release of excitatory transmitter in the medial prefrontal cortex of mice. GDF-15 is also involved in the complex modulation of cancer and cardiovascular disease. Here, we reviewed studies involving the modulation of GDF-15 expression and its mechanisms, the primary pathological and physiological functions of GDF-15 in neurological and cardiovascular systems, and its role in cancer progression. The biological effects and the values of GDF-15 in basic research and clinical applications were also addressed.

Key words: growth differentiation factor-15; signaling pathway; nervous system; cancer; cardiovascular system

上世纪 90 年代, 至少 7 所实验室分别独立报道了一种新的转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β) 超家族成员, 即生长分化因子-15 (growth differentiation factor-15, GDF-15)。GDF-15 主要由巨噬细胞及外分泌腺如前列腺表达, 广泛分

布于哺乳动物的各个组织, 并在胚胎发育、调节细胞压力信号、炎症反应以及组织损伤后修复中都起到重要的作用。根据其 TGF- β 家族成员的关系以及不同的克隆方法, GDF-15 也被命名为巨噬细胞抑制因子-1 (macrophage inhibitory cytokine-1, MIC-

Received 2016-07-11 Accepted 2016-10-09

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-51630651; E-mail: yamei@fudan.edu.cn

1)、胎盘骨形态形成蛋白 (placental bone morphogenetic protein, PLAB)、前列腺衍生因子 (prostate-derived factor, PDF)、胎盘转化生长因子 β (placental transforming growth factor β , PTGFB) 和非甾体类抗炎药活化基因 (nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1, NAG-1)^[1–5]。近年来, 已有较多研究发现, GDF-15 在心血管疾病、癌症和神经系统中的表达、分泌和功能涉及多种调节机制, 并且可调控不同细胞的反应, 证明 GDF-15 具有重要的生理作用。而 GDF-15 在各类疾病和癌症发生过程中的异常表达, 使其成为一个潜在的疾病预测蛋白以及治疗靶点。

本文总结了近年来关于 GDF-15 的基础和临床研究进展, 尤其是在神经系统、心血管系统以及癌症中的研究, 为将来 GDF-15 在临床上的应用提供参考。

1 GDF-15的生物学特性

1.1 GDF-15的基因结构和蛋白表达

人源 GDF-15 的基因位于 19 号染色体短臂区 12 区到 13 区 1 带, 包含两个外显子和一个内含子, 外显子 I 和外显子 II 分别在 5' 端和 3' 端包含一个非翻译区, 其编码区域长度分别为 238 bp 和 647 bp, 可编码形成一个含 308 个氨基酸的蛋白^[3]。同样, 鼠源的 GDF-15 基因也包含两个外显子和一个内含子, 可编码含 303 个氨基酸的蛋白^[4]。人源 GDF-15 前体蛋白包含了 N 端 29 个氨基酸的信号肽, 167 个氨基酸的前肽以及 C 端 112 个氨基酸的成熟 GDF-15 肽段, 其中在 C 端的成熟 GDF-15 肽段包含由 7 个半胱氨酸残基构成的 TGF- β 超家族保守的半胱氨酸结 (cystine knot) 结构域。两个 GDF-15 前体蛋白通过半胱氨酸结的二硫键连接成同源二聚体, 随后被 furin-like 蛋白酶在 RXXR 区剪切后形成一个含 224 个氨基酸、分子量约为 25 kDa 的可分泌 GDF-15^[6], 这一系列剪切过程通常在胞内反式高尔基体中进行。但是在前列腺癌细胞系中发现许多不一样的加工修饰过程, 并且有部分未经剪切的仍带有前肽的 GDF-15 也可被分泌入胞外基质中^[7]。一经释放, 前体蛋白可与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 结合, 而且在特定条件刺激下, 与 ECM 结合的前体蛋白在微环境中可快速释放成熟的 GDF-15, 保证了体内血清中成熟 GDF-15 水平和 ECM 潜在 GDF-15 库之间的平衡^[8]。

1.2 GDF-15的转录调控

人源 GDF-15 基因开放阅读框上游的 350 bp 是重要的转录调控区域, 包含多个顺式和反式作用元件。对启动子区进行克隆分析发现其包含三个 Sp1 结合位点 (Sp-1A, Sp-1B 和 Sp-1C), 主要负责 GDF-15 的本底转录调控^[9]。而两个位于启动子区的 p53 位点和一个位于 5' 非翻译区 (5' UTR) 的 p53 位点则介导了由饮食及外源化合物诱导的 GDF-15 的表达^[10, 11]。大量的实验也证明了细胞应激信号或者炎症反应激活的 p53/p21^{WAF1/CIP1} 信号通路或 DNA 损伤, 可引起下游 GDF-15 的表达从而介导细胞生长停滞或者凋亡^[10, 12, 13]。但同时, GDF-15 的表达也存在 p53 非依赖的调控机制。多种环氧酶 (cyclooxygenase, COX) 抑制剂, 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 以及多种植物提取化合物会引起由早期生长反应因子 (early growth response 1, EGR-1) 转录因子介导的 GDF-15 的转录翻译^[14–17]。而最近的研究表明, 转录因子 NF- κ B、ATF-3 和 C/EBP β 也可参与调控 GDF-15 的表达^[18–20]。

除了转录因子可对 GDF-15 基因进行转录调控外, GDF-15 基因的表观遗传修饰也会对 GDF-15 的转录表达产生重要影响。Yoshioka 等人发现组蛋白脱乙酰酶抑制剂曲古抑菌素 (trichostatin A, TSA), 不仅可促进成胶质瘤细胞系中 GDF-15 启动子与 Sp1 和 EGR-1 的相互作用从而引起 GDF-15 的表达增高, 而且还可增强 GDF-15 mRNA 在转录后水平的稳定性^[21]。启动子上异常超甲基化状态被认为是使肿瘤抑制基因沉默的一种普遍机制。多种成胶质瘤细胞系以及少突神经胶质瘤细胞中的 GDF-15 基因的启动子区域存在密集的甲基化, 而 DNA 上 -53 以及 +55 两个 CpG 位点上的甲基化决定了 GDF-15 的少量表达, 因为 -53 位点上的甲基化影响了 GDF-15 启动子与 EGR-1 的结合, 从而抑制了 GDF-15 的转录翻译。在神经胶质瘤细胞和 MCF-7 细胞上的实验均表明, 运用一种脱甲基化合物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza) 可显著升高 GDF-15 的本底表达, 继续使用 GDF-15 的诱导剂则可使 GDF-15 的表达量显著上升^[22, 23]。许多其他甲基化状态未知的肿瘤细胞中, 却发现高表达 GDF-15^[24–28], 这可能与这些细胞中缺少 GDF-15 基因甲基化 CpG 岛的状态相关。这也提示了 GDF-15 的表达在不同的组织、不同细胞以及不同

状态下,存在着多种不同的调控机制。

1.3 GDF-15的组织分布与表达调控

原位杂交以及免疫组织化学实验显示,人源和鼠源 GDF-15 在正常生理状态的成体组织中有较类似的分布,均广泛分布于各类组织中,其中主要有肾、支气管、外分泌腺、巨噬细胞以及大脑脉络丛^[29,30]。然而,一些组织的 GDF-15 分布在小鼠和人类之间存在差异,如人源 GDF-15 在前列腺、结肠、尤其是胎盘内具有较高表达,而在肝脏中表达甚少^[10];而鼠源 GDF-15 则在肝脏大量表达,在前列腺和胚胎内表达较少^[31]。对鼠源和人源的 GDF-15 基因进行序列比对发现,两者在启动子区仅有 39% 的同源^[9],这可能解释了 GDF-15 在人类和小鼠分布差异的原因。同时,人源和鼠源的 GDF-15 在 N 端区域的差异也可能导致了其不一样的表达分布。

虽然 GDF-15 分布广泛,但是其在血清中的浓度根据性别、年龄以及健康状态不同而有所差异。通常,正常静息状态的细胞中的 GDF-15 表达普遍较低,伴随着不同的应激反应,如低氧和缺氧症、炎症、短波长光暴露、急性组织损伤、心血管疾病和癌症进展期, GDF-15 的表达会大幅增加^[32-37]。另外孕妇或者潜在的中风、心肌梗死患者的血清中 GDF-15 水平也有显著的升高现象^[38,39]。目前,大

部分针对 GDF-15 异常表达的研究主要集中在神经系统急性损伤、恶性肿瘤以及心血管疾病上,而内源性 GDF-15 在不同疾病中所起到的多效性作用则是其中的研究重点。

1.4 GDF-15的作用靶点和信号通路

TGF- β 超家族包括 TGF- β 1、2 和 3, GDFs, 骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs), 活化素, 淋巴结, 抑制素, 肌生成抑制蛋白和抗苗勒氏管激素 (anti-Müllerian hormone, AMH), 大部分家族成员可通过作用于 TGF- β I 型和 II 型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体,从而介导胞内信号转导,包括 Smad 依赖及非依赖的信号通路。TGF- β 跨膜受体复合物包含了两个 I 型受体和两个 II 型受体(分别表示为 T β RI 和 T β RII)。T β RI 和 T β RII 由三个结构域构成:一个 N 端胞外配体结合域;一个跨膜区域;一个 C 端丝氨酸/苏氨酸激酶结构域。当配体与 T β RII 结合时,T β RII 可与 T β RI 结合形成具有高亲和性的配体-受体四聚体复合物,其中 T β RII 可磷酸化 T β RI 的 SGSGSG 序列(GS 结构域),使其可磷酸化 Smad 蛋白介导胞内信号通路^[40]。同时,不少研究显示,TGF- β 超家族成员也可激活胞内其他非 Smad 依赖的信号通路,如 p38/MAPK、JNK、Ras-ERK、RhoA-ROCK 以及 Cdc42/Rac 等^[41,42](图 1)。

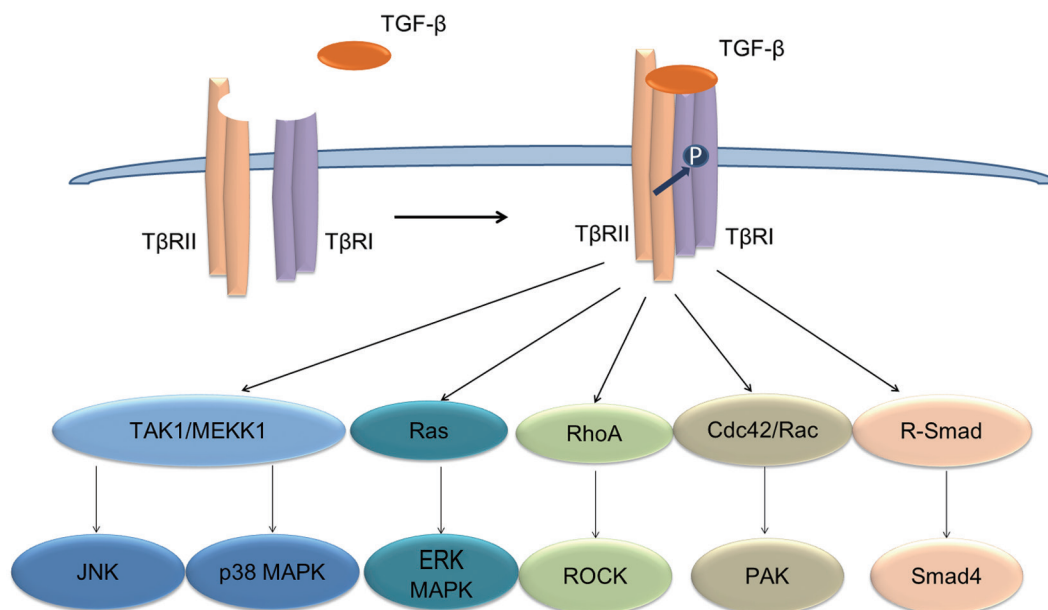


图 1. T β RI 和 T β RII 介导的 Smad 信号通路和非 Smad 信号通路

Fig. 1. T β RI and T β RII mediated Smad and non-Smad signal pathways. Apart from the activation of classical Smads signaling pathways, non-Smad signaling pathways can be mediated by type II or type I receptors without an apparent direct effect on Smads activation. The non-Smad signalling pathways including Cdc42/Rac, Ras, RhoA and TAK1/MEKK1 etc. Only the best-characterized pathways are shown.

作为 TGF- β 超家族中的一员, GDF-15 可通过经典的 TGF- β 受体和信号传导机制激活 Smad 信号通路^[43, 44], 也可激活胞内非 Smad 信号通路。研究发现内源及外源 GDF-15 的过表达可刺激 p38、ERK1/2 以及 Akt 的磷酸化从而促进雷帕霉素敏感的卵巢癌细胞的生长和浸染^[45]。此外, GDF-15 能激活 PI3K/Akt 抑制 MAPK/ERK 信号通路, 抑制由低钾无血清诱导的大鼠小脑颗粒细胞的凋亡^[46]。Johnen 等人发现 GDF-15 可调控下丘脑影响食欲而造成体重下降, 而这一机制是由 GDF-15 在下丘脑神经元上作用于 T β RII, 激活了下游 ERK1/2 信号和 Stat3^[47]。本研究组在大鼠小脑颗粒细胞上的研究也显示, GDF-15 孵育 24 h 可通过 T β RII 激活 Src 激酶和 Akt/mTOR 信号通路, 促进延迟整流外向钾通道的 K_v2.1 α -亚单位的翻译, 并减少溶酶体介导的蛋白降解^[48]; 同时 GDF-15 孵育通过 T β RII 激活的 Akt/mTOR 和 ERK 信号通路也可促进 L-型钙通道的 Ca_v1.3 α -亚单位的表达^[49]。另外, 本研究组最新的研究结果显示, GDF-15 短时间 (15~60 min) 孵育小鼠内侧前额叶脑片, 同样可通过 T β RII-ERK 信号通路促进 T-型钙通道的 Ca_v3.1 和 Ca_v3.3 α -亚单位的上膜表达, 从而增强锥体神经元的突触前兴奋性递质的释放^[50]。以上研究表明, GDF-15 在中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中的作用与 T β RII 介导的非 Smad 信号通路密切相关。此外, 近期还有研究发现在海马发育时期, GDF-15 可通过激活 CXC 趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor 4, CXCR4) 而促进表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 信号通路, 调节细胞的迁移和增殖^[51]。以上研究说明了 GDF-15 的作用机制涉及了多种信号通路, 而且可能作用于 TGF- β 受体之外的多种细胞因子受体。鉴于 GDF-15 在疾病预测及治疗中潜在的广泛运用前景, 对 GDF-15 生理功能与具体作用机制的深入研究具有重要的意义。

2 GDF-15在神经系统的作用

2.1 GDF-15在CNS及外周神经系统(peripheral nervous system, PNS)的分布与表达

GDF-15 在 CNS 和 PNS 都有广泛的分布。RT-PCR 和 Western Blotting 的结果显示, 与肝脏、肺和肾等器官相比, 大鼠和小鼠的正常 CNS、PNS、分离的星形胶质细胞和背根神经节细胞上的 GDF-

15 的 mRNA 和蛋白表达量都处于非常低的水平, 在少突胶质细胞中甚至不能检测到 GDF-15^[52]。而在正常围产期和成年大鼠的脉络丛中能够检测到高水平的 GDF-15 mRNA 和蛋白, 并且 GDF-15 由此可分泌至脑脊液中。除脉络丛外, 新生大鼠的脑室室管膜细胞, 纹状体室下区以及丘脑/海马的非神经细胞群也能通过免疫印迹检测到 GDF-15^[30]。

对 GDF-15 缺失小鼠的研究发现, GDF-15 敲除小鼠在出生后, 会逐渐缺失脊髓、面部三叉神经元和运动神经元, 这种缺失在小鼠六个月时达到最大, 接近 20%, 同时还伴随着运动轴突的减少和严重的旋杆技能损伤。同样减少的还有背根神经节的感觉神经元, 而交感神经元并未受到影响。研究显示 GDF-15 敲除小鼠与睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) 敲除小鼠表现出相类似的运动神经元缺失的表型, 但是在 GDF-15 敲除的小鼠坐骨神经中 CNTF 以及其他神经营养因子的表达并未受到影响, 表明 GDF-15 敲除小鼠并不是通过影响 CNTF 的表达而出现相应的表型, 说明 GDF-15 对于运动和感觉神经元具有重要的神经营养作用^[53]。

虽然在生理状态下, GDF-15 在成年动物神经系统中的表达普遍低于可检测范围, 但伴随着 CNS 损伤而其表达量被显著调控的现象引起了人们的重视。研究显示, 皮层区域的冰冻损伤会使损伤邻近区域以及远离损伤区的丘脑区 (可能存在投射关系) 的大部分神经元和小部分的小胶质细胞上的 GDF-15 mRNA 显著增加, 而对星形胶质细胞没有任何影响^[30]。在大脑中动脉闭塞诱导的脑缺血小鼠模型上, 也检测到类似的结果。脑缺血损伤 3 h 和 24 h 后, 在海马区的齿状回及 CA1 区和顶叶皮层神经元分别检测到 GDF-15 mRNA 的显著上调, 且有一小部分的小胶质细胞呈现 GDF-15 免疫阳性, 而星形胶质细胞均为阴性^[54]。一份针对缺血性脑卒中患者的研究报告也发现, 有 68% 的缺血性脑卒中的患者在发病 6 h 后, 血液内 GDF-15 的水平达到一个不正常的高值 (大于 1 200 ng/L), 而 7 天之后, GDF-15 也仅下降了 8%, 这一研究显示了缺血性脑卒中患者的 GDF-15 循环水平的上升^[55]。以上研究显示 GDF-15 在上述脑损伤及病理状态下的表达大量增加, 提示其可能存在一些重要的生理和病理功能。

2.2 GDF-15在神经系统中的生物学功能

虽然小鼠视神经挤压伤同样引起视网膜内 GDF-15 mRNA 和蛋白的增加, 但是视网膜神经节

细胞的死亡程度和时间进程在野生型小鼠和 GDF-15 敲除小鼠之间却不存在显著差异, 调控神经节细胞凋亡与存活的一些细胞因子的表达, 如 ATF3、Bad、Bcl-2 和半胱氨酸蛋白酶 8 (Caspase-8), 在两种基因型小鼠之间也均无显著差异^[35]。类似的情况也发生在由大脑中动脉闭塞诱发的小鼠脑缺血模型上, 野生型和 GDF-15 敲除小鼠的梗死面积对比分析结果并无差异^[54]。除 CNS 外, PNS 坐骨神经的损伤也使得背根神经节细胞 (dorsal root ganglia, DRG) 中 GDF-15 的表达在 7 天后达到峰值, 与 CNS 上的研究结果一致, 野生型和 GDF-15 敲除小鼠的 DRG 凋亡情况以及再生轴突的髓鞘再生均无差异。但是野生型小鼠的再生轴突在损伤 9 周后, 其直径较 GDF-15 敲除小鼠的大, 且在肌电图测试中表现出更好的活力, 显示其更为成熟, 具有更好的功能恢复^[56]。以上研究结果似乎表明, 内源性 GDF-15 表达量的升高具有促进 PNS 再生轴突功能恢复的作用, 但并不能促进损伤区域神经元存活。然而 Unsicker 等人最新的研究却发现, 对 *GDF-15^{+/-}* 和 *GDF-15^{-/-}* 小鼠的内侧前脑束 (medial forebrain bundle, MFB) 分别注射 6-OHDA 14 天后, 均会引起黑质纹状体多巴胺能神经元的减少, *GDF-15^{+/-}* 小鼠可剩余 24% 神经元存活, 但是 *GDF-15^{-/-}* 小鼠的 MFB 区域仅剩 5.5% 的存活神经元, 而且其活化的以及总的小胶质细胞的量较 *GDF-15^{+/-}* 小鼠也有显著降低^[57]。这一发现与该研究组之前发现的 GDF-15 对多巴胺能神经元营养活性的研究一致: 无论在体或体外实验, 外源性 GDF-15 都可促进损伤的多巴胺能神经元的存活, 并可防止损伤模型小鼠病态旋转活动的发生^[52, 58]。以上研究证明了 GDF-15 对于多巴胺能神经元具有重要的神经营养作用, 可促进多巴胺能神经元的存活, 而这一作用使 GDF-15 具有潜在的治疗帕金森病的作用, 具有重要的临床意义。

除了对多巴胺能神经元的作用外, 外源性 GDF-15 对其他神经元也具有神经营养作用。人类脐带血来源的间充质干细胞旁分泌产生的 GDF-15 可促进小鼠海马区神经干细胞的增殖分化以及突触囊泡的生成^[59]。外源的 GDF-15 在体内的表达也可促进 PNS 损伤的神经元的轴突再生以及感觉恢复^[60]。GDF-15 还可抑制由低钾无血清诱导大鼠小脑颗粒神经元的凋亡作用^[46]。GDF-15 对胶质细胞的功能与作用目前了解得还不全面。之前有研究发

现皮层区的损伤和海马区缺血损伤可引起小部分小胶质细胞表达 GDF-15, 但并不使星形胶质细胞表达 GDF-15^[25, 49]。虽然星形胶质细胞具有重要的神经营养功能, 但是皮层损伤时 GDF-15 的表达情况似乎表明, 在应激状态下由神经元自分泌或者旁分泌的 GDF-15 是直接作用于神经元起神经营养作用的, 并不需要通过星形胶质细胞。然而近期也有研究发现, 可导致神经元兴奋毒性以及促进胶质细胞活性的海藻酸, 能引起海马区星形胶质细胞内 GDF-15 的大量表达, 并激活 NF- κ B 信号通路^[61], 显示星形胶质细胞通过 GDF-15 起到了一个调控炎症反应的作用。综合上述研究, GDF-15 对于不同的神经元群和胶质细胞具有不同的生理作用。

在神经系统中, GDF-15 除了具有神经营养功能外, 还具有其他一些功能, 尤其是在病理或者老年状态。胶质母细胞瘤表达的 GDF-15 会促进恶性胶质瘤细胞的增殖并帮助其逃避免疫宿主的攻击^[62, 63]。GDF-15 在生理和病理状态下还会作用于下丘脑和脑干区, 引起机体食欲下降和体重减轻, 而多项研究表明癌症患者血清内 GDF-15 浓度会显著升高, 这可能就是引起癌症患者食欲不振的原因^[64]。值得引起注意的是, 澳大利亚的一篇研究报告指出, 老年人血清内的 GDF-15 水平越高, 该老年人的记忆和认知能力越低^[65]。虽然其中的病理生理学关系需要更进一步的证据与研究, 但是这一现象也要求研究者们对 GDF-15 在神经系统中的作用引起重视。

上述的研究多集中在 GDF-15 在组织病理损伤情况下对神经元存活、修复和功能的影响, 而本实验室则针对 GDF-15 对生理状态下神经元的离子通道和递质释放的影响进行了研究。研究结果显示 GDF-15 长时间 (24 h) 处理神经元, 可通过促进转录翻译以及减少降解途径, 提高大鼠小脑颗粒细胞 $K_v2.1$ 以及 $Ca_v1.3 \alpha$ -亚单位蛋白的表达量, 使颗粒细胞神经元膜上延迟整流 K^+ 电流 (I_K) 以及 Nifedipine 敏感的高电压激活 Ca^{2+} 电流 (I_{Ca}) 的幅度显著升高^[48, 49]; 短时间 (60 min 内) 应用 GDF-15, 则可激活内侧前额叶皮层神经元蛋白上膜途径, 增加 T-型钙通道的 $Ca_v3.1$ 和 $Ca_v3.3 \alpha$ -亚单位的膜上表达量, 从而介导突触前谷氨酸递质释放^[50]。我们的研究结果提示, GDF-15 除了对损伤神经元具有一定的神经营养功能外, 对正常生理状态下神经元的离子通道和递质释放具有调控作用, 从而影响神经元的电活动

和兴奋性, 在 CNS 中有着广泛的生理作用。

3 GDF-15与心血管疾病

2002 年, Brown 等人对患有心血管疾病的女性以及同样年龄和吸烟史的健康女性进行长达 4 年的追踪, 首次发现患有心血管疾病的女性血浆中 GDF-15 的水平显著高于健康女性, 并且是独立于其他传统的患病风险因素的^[39]。此后, 越来越多的研究发现了 GDF-15 与多种疾病之间的关系。如 GDF-15 在心力衰竭、冠状动脉疾病、房颤、糖尿病、癌症以及认知功能衰退中都有非常重要的作用^[66, 67]。其中心脑血管疾病包括动脉粥样硬化、高血压、心肌肥大或衰竭, 心肌梗死、冠状动脉疾病以及中风等是在世界范围内发病最广的主要致死性疾病。因此研究 GDF-15 在心脑血管中的作用及其机制具有重要的研究价值和临床意义。

3.1 GDF-15在心血管疾病中作为生物标志物的潜在价值

健康的心肌细胞并不会表达 GDF-15, 但是在受到外界压力如氧化应激或炎症因子, 以及小鼠或患者发生心肌梗死时, GDF-15 就会大量产生^[68], 这一特性使 GDF-15 在心血管疾病中具有潜在的疾病预测和诊断的价值。高血压患者 GDF-15 血清水平显著高于正常人, 而患有左心室肥厚的高血压患者的 GDF-15 血清水平又显著高于普通高血压患者, 并且血清中的 GDF-15 的水平与左心室肥厚呈现一个正相关的关系, 表明 GDF-15 在高血压患者的左心室肥厚发展过程中起到一定作用^[69]。而 Hantani 等人发现, GDF-15 可作为区分肥大性心肌病 (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) 和高血压性左心室肥厚 (hypertensive left ventricular hypertrophy, H-LVH) 的一个有效生物标志物, 因为 H-LVH 患者的 GDF-15 血清水平显著高于 HCM, 因此 GDF-15 是 H-LVH 独立的预测分子^[70]。在对 HCM 和 H-LVH 患者进行治疗时, GDF-15 可作为依据帮助选择不同的治疗方案。

对非 ST 段抬高的急性冠脉综合征 (non ST-elevation acute coronary syndrome, NSTEMI-ACS) 患者进行 2 年的随访, 进行随机的介入和保守治疗, 发现患者血清中 GDF-15 的水平显著升高^[71]。研究指出, 当人体血清中 GDF-15 的含量大于 1 800 ng/L 时, 一年之内有致死风险^[72]。然而 GDF-15 水平在 NSTEMI-ACS 介入治疗中却起着有益的作用。当

GDF-15 血清浓度低于 1 200 ng/L 时, 即使在 ST 段压低或者肌钙蛋白 T 大于 0.01 $\mu\text{g/L}$ 时, 稳定冠状动脉疾病二期血管再生 (FRISC-II) 也并未从介入治疗中获得益处。反而 GDF-15 血清水平高于 1 200 ng/L, 特别是高于 1 800 ng/L 的患者可以通过介入治疗减少非致死性心肌梗死或心脏性死亡^[73]。表明 GDF-15 不仅可作为疾病的生物标志物, GDF-15 的血清水平还可进一步为治疗策略的选择提供依据。除了为 NSTEMI-ACS 患者进行危险等级分类并提供治疗依据外, GDF-15 水平还可为患者的预后效果提供信息。GDF-15 水平正常表明预后效果好, 若水平升高表明预后效果差, 有致死或再次梗死的风险^[71]。但具体的预后信息, 还需要结合临床上其他已建立的生物标志物如肌钙蛋白变化和超声心动图的信息才能进行判断。如将 GDF-15 与脑钠肽或者 hs-TnT 相结合可帮助判断将患者分为具有不同风险的不同类型, 并从射血分数正常的人群中分辨心脏衰竭患者^[74, 75]。

3.2 GDF-15在心血管疾病中的作用及机制

GDF-15 敲除小鼠在进行冠状动脉结扎后出现明显的心肌肥厚, 两周后出现心室功能障碍, 而野生型小鼠表现正常; 而在心脏过表达 GDF-15 的小鼠也表现出部分抑制心肌肥大的现象^[43], 表明 GDF-15 在心脏中起着抗心肌肥大的作用。研究发现 Smad 依赖的信号通路可以抑制心肌细胞的凋亡以及保护心肌细胞抵抗肥大和纤维化^[76]。Xu 等人认为 GDF-15 是通过激活 Smad2/3 抑制了心脏肥厚和细胞凋亡, 因为 Smad2/3 在心肌细胞内的过表达显示出与 GDF-15 相同的保护作用, 而 Smad6 或 Smad7 的激活则会消除其抗心肌肥大作用^[43]。而另一方面, GDF-15 还可以瞬时激活 Akt 和 ERK1/2^[43], Akt 的激活可调控心肌细胞活力^[77], 而 ERK1/2 激活则可调节细胞的生存^[78], 两条信号通路都具有心脏保护作用。而另一项研究却发现 GDF-15 可通过抑制 EGFR 反式激活, 从而抑制其下游的 Akt/ERK 信号通路来抵抗去甲肾上腺素引起的心肌肥大^[79]。以上的研究表明, 在发生心肌肥大时, GDF-15 的表达水平升高可对心肌肥大产生抑制作用, 对心脏进行保护。

动脉粥样硬化斑块由内皮功能紊乱引起, 伴随着氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, oxLDL) 在皮下间隙沉积, 使炎症单核细胞聚集在动脉血管壁分化成巨噬细胞, 形成脂肪堆积的

泡细胞^[80]。最近有研究表明, GDF-15 浓度大于 50 ng/mL 时, 具有抑制内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 生长的作用, 但是当浓度小于 5 ng/mL 时, 却具有促进 ECs 生长和促血管生成作用^[81, 82]。在人类粥样硬化颈动脉上, 发现 GDF-15 与巨噬细胞共定位, 推测其调节了巨噬细胞的凋亡和炎症反应, 参与动脉粥样硬化的形成^[83]。在 GDF-15 敲除小鼠上的实验也支持了这一研究, GDF-15 缺失抑制了 TßRII/C-C 趋化因子二型受体 (C-C chemokine receptor type 2, CCR2) 介导的巨噬细胞趋化作用从而抑制早期动脉粥样硬化的形成和促进晚期斑块的稳定^[84]。另一方面, GDF-15 缺失也抑制了血管损伤引起的 IL-6 依赖的炎症反应, 从而抑制了动脉粥样硬化的形成。因此 GDF-15 调控的细胞凋亡也许可作为动脉粥样硬化和斑块发展的一个有效的治疗靶点。

Kempf 等人最近还研究发现 GDF-15 通过行使抗炎因子的作用, 干扰趋化因子信号和活化整合素从而抑制多形核白细胞 (polymorph nuclear leukocytes, PMNs) 聚集于梗死部位, 保护心肌梗死小鼠模型免受心脏破裂致死^[85]。该研究组之前还发现局部缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 刺激通过 NO- 过氧硝酸盐依赖的信号途径诱导了心肌细胞表达 GDF-15 mRNA 和前肽。为了验证 GDF-15 在 I/R 过程中的作用, Kempf 等人将小鼠进行冠状动脉结扎 1 h 后进行再灌注 24 h, 结果显示, GDF-15 敲除小鼠显示出比野生型小鼠更大的梗死面积和在梗死区域周边更多的凋亡心肌细胞。并且体外的实验也证明了 GDF-15 可以抑制 I/R 引起的心肌细胞的凋亡^[86]。这一实验表明内源性的 GDF-15 在心血管中具有促进损伤组织修复、抑制细胞凋亡的功能。

以上的研究说明, GDF-15 是一个在心血管系统疾病中非常有前景的生物诊断分子, 并且有可能作为一个预后生物标志分子而指导不同心血管疾病的治疗策略。但是更多的针对 GDF-15 在不同疾病中的研究和应用仍需要进行探索。另一方面, 虽然基础研究结果显示 GDF-15 对心肌损伤和心肌肥厚等有促进修复作用, 但是它同时也与粥样动脉硬化形成相关, 因此 GDF-15 在心血管系统疾病中的治疗应用研究仍有很多路要走。

4 GDF-15与癌症发生进程

GDF-15 在癌症的发生和进展中有着非常复杂的作用, 虽然有大量的研究针对 GDF-15 在肿瘤和

癌症中的表达以及作用进行研究, 其扮演的角色、作用机制仍未被解释清楚。目前已观察到在众多的恶性肿瘤组织, 培养的癌细胞以及处于癌症浸染和转移阶段的患者血浆内, GDF-15 的表达量都会大量地异常升高^[24-28]。例如, 临床上发现, 随着转移性前列腺癌症的发展, 患者血清内 GDF-15 的水平也逐渐升高^[24]; 对转移性黑色素瘤患者的研究发现, 未切除 IV 期患者 GDF-15 的血清水平显著高于切除 I/II 期的患者^[87]。并且癌症患者血清内的高浓度 GDF-15 可能意味着患者的低生存率和预后不良状态^[88, 89]。因此, 血清中分泌的 GDF-15 可作为一个新型的临床诊断预测生物标志物, 以更好地对癌症患者的疾病进展进行风险评估。

但是关于 GDF-15 在癌症中所起的病理生理作用至今没有统一的结论, 一些实验表明 GDF-15 具有抑制癌细胞的活性, 而有些数据却显示它可促进癌症的进程。根据不同种类的癌症和癌症的不同阶段, GDF-15 可表现出抑癌或者促癌作用。

4.1 GDF-15抑制早期肿瘤生成

在 HCT116、MCF-7 和恶性胶质瘤细胞等肿瘤细胞中过表达 GDF-15 并注射裸鼠细胞, 发现可以抑制肿瘤的生成^[5, 90, 91], 在一部分肿瘤细胞上过表达 GDF-15 还可引起细胞的凋亡^[92]。过表达 GDF-15 的转基因小鼠则更直接地证明了 GDF-15 具有抑癌作用。无论是肠内致癌物 AOM 诱导还是与自发肠腺瘤 *Apc^{min}* 小鼠杂交遗传, GDF-15 过表达小鼠肠内病灶数或息肉数都较野生型小鼠要低, 而不易产生肠道肿瘤^[93]。另外一个有趣的结果发现, *Apc^{min}* 小鼠只有在接受 COX 抑制剂苏灵大治疗引起 GDF-15 表达后, 才能抑制肠内息肉的生成^[94]。同样, GDF-15 过表达小鼠能抵抗氨基甲酸乙酯诱导的肺部肿瘤以及抑制与前列腺癌转基因小鼠杂交后的前列腺肿瘤的发生^[95, 96]。这些结果表明 GDF-15 在肿瘤发生早期起到了抑制肿瘤的作用。

4.2 GDF-15促进晚期癌症进展

在一些小鼠肿瘤移植实验中发现, 人源的 GDF-15 可提高肿瘤的生成率。如在 PC-3 细胞过表达 GDF-15 会促进该细胞的迁移和侵染性, 并且原位移植表达 GDF-15 的 PC-3 细胞可产生更多的转移性肿瘤^[97]。虽然在关于 GDF-15 抑制肿瘤生成的一项研究中发现, GDF-15 的表达可抑制转基因的前列腺癌小鼠的前列腺肿瘤的生成, 但是 GDF-15 却可以促进转移性肿瘤转移至其他器官^[96]。近期也

有研究显示 GDF-15 促进了神经胶质瘤细胞的迁移和浸染^[98]。这些研究表明 GDF-15 可能促进了癌症的进展和浸染至其他器官, 可能在癌症后期有较大的影响。另外, GDF-15 可通过反式激活 ErbB2/HER2 原癌基因从而激活人乳腺癌和胃癌细胞中的 Akt 和 ERK1/2 信号通路, 促进癌细胞的生长^[99], 说明 GDF-15 在过表达 *HER-2* 原癌基因的肿瘤中起着正向调控细胞生长的作用。

综上所述, GDF-15 的抑癌和促癌作用均有实验支持。GDF-15 在癌症早期通过抑制肿瘤细胞生长并诱导细胞凋亡起到抑制癌症发生的作用, 而在疾病晚期, 分泌的 GDF-15 则会促进细胞的增殖, 迁移以及癌细胞的转移。因此, GDF-15 在癌症晚期是一个潜在的治疗靶点, 并且是反映肿瘤大小和发展阶段的直观指标, 能预示患者的预后效果及存活概率。

5 总结与展望

以上研究表明, GDF-15 可能是一个在损伤或者病理应激条件下被诱导激活的可调控基因, 并且在不同的细胞、组织和生理状态下具有不同的生理作用, 如对细胞增殖、迁移、存活、修复等。但是, 迄今为止对于 GDF-15 在病理生理中的分子机制和生物活性研究仍比较欠缺, 其作用价值值得进一步发掘。本研究组研究结果提示 GDF-15 在 CNS 中可通过激活 T β RII 介导的下游 Akt/mTOR 或 ERK 信号通路, 调控神经元细胞膜离子通道的表达或上膜^[43,44], 这个作用机制和信号通路是否介导了 GDF-15 在其他系统的生理或病理作用, 仍需要更多的深入研究。

除了本文上述的 GDF-15 在神经系统、癌症、心血管疾病中的生物学作用外, GDF-15 在血液系统、机体代谢过程、消化系统、呼吸系统、泌尿生殖系统、骨骼和皮肤中都具有一定的作用。其中 GDF-15 可作为疾病诊断预测生物标志物的作用引起了广泛的关注并取得一定的研究进展, 但是值得注意的是, GDF-15 的表达与不同年龄、人种、血压、肾脏功能障碍、吸烟史以及炎症反应相关, 因此, 在临床上利用 GDF-15 进行疾病诊断预测时, 需要结合其他生理功能和生物标志物的检测。

参考文献

- 1 Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh BJ, Nicholson RC, Fairlie WD, Por SB, Robbins JM, Breit SN. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(21): 11514–11519.
- 2 Hromas R, Hufford M, Sutton J, Xu D, Li Y, Lu L. PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1354(1): 40–44.
- 3 Lawton LN, Bonaldo MF, Jelenc PC, Qiu L, Baumes SA, Marcelino RA, de Jesus GM, Wellington S, Knowles JA, Warburton D, Brown S, Soares MB. Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene* 1997; 203(1): 17–26.
- 4 Bottner M, Laaff M, Schechinger B, Rappold G, Unsicker K, Suter-Crazzolara C. Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene* 1999; 237(1): 105–111.
- 5 Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol* 2001; 59(4): 901–908.
- 6 Fairlie WD, Moore AG, Bauskin AR, Russell PK, Zhang HP, Breit SN. MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukoc Biol* 1999; 65(1): 2–5.
- 7 Bauskin AR, Jiang L, Luo XW, Wu L, Brown DA, Breit SN. The TGF-beta superfamily cytokine MIC-1/GDF15: secretory mechanisms facilitate creation of latent stromal stores. *J Interferon Cytokine Res* 2010; 30(6): 389–397.
- 8 Bauskin AR, Brown DA, Junankar S, Rasiah KK, Eggleton S, Hunter M, Liu T, Smith D, Kuffner T, Pankhurst GJ, Johnen H, Russell PJ, Barret W, Stricker PD, Grygiel JJ, Kench JG, Henshall SM, Sutherland RL, Breit SN. The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome. *Cancer Res* 2005; 65(6): 2330–2336.
- 9 Baek SJ, Horowitz JM, Eling TE. Molecular cloning and characterization of human nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene promoter. Basal transcription is mediated by Sp1 and Sp3. *J Biol Chem* 2001; 276(36): 33384–33392.
- 10 Li PX, Wong J, Ayed A, Ngo D, Brade AM, Arrowsmith C, Austin RC, Klamut HJ. Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. *J Biol Chem* 2000; 275(26): 20127–20135.
- 11 Baek SJ, Wilson LC, Eling TE. Resveratrol enhances the expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53. *Carcinogenesis* 2002; 23(3): 425–434.

- 12 Yang H, Filipovic Z, Brown D, Breit SN, Vassilev LT. Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(10): 1023–1029.
- 13 Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(1): 109–114.
- 14 Baek SJ, Kim JS, Moore SM, Lee SH, Martinez J, Eling TE. Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein. *Mol Pharmacol* 2005; 67(2): 356–364.
- 15 Martinez JM, Baek SJ, Mays DM, Tithof PK, Eling TE, Walker NJ. EGR1 is a novel target for AhR agonists in human lung epithelial cells. *Toxicol Sci* 2004; 82(2): 429–435.
- 16 Woo SM, Min KJ, Kim S, Park JW, Kim DE, Chun KS, Kim YH, Lee TJ, Kim SH, Choi YH, Chang JS, Kwon TK. Silibinin induces apoptosis of HT29 colon carcinoma cells through early growth response-1 (EGR-1)-mediated non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 (NAG-1) up-regulation. *Chem Biol Interact* 2014; 211: 36–43.
- 17 Yang MH, Kim J, Khan IA, Walker LA, Khan SI. Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (NAG-1) modulators from natural products as anti-cancer agents. *Life Sci* 2014; 100(2): 75–84.
- 18 Lee SH, Krisanapun C, Baek SJ. NSAID-activated gene-1 as a molecular target for capsaicin-induced apoptosis through a novel molecular mechanism involving GSK3beta, C/EBPbeta and ATF3. *Carcinogenesis* 2010; 31(4): 719–728.
- 19 Kim KJ, Lee J, Park Y, Lee SH. ATF3 mediates anti-cancer activity of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in human colon cancer cells. *Biomol Ther (Seoul)* 2015; 23(2): 134–140.
- 20 Shim M, Eling TE. Protein kinase C-dependent regulation of NAG-1/placental bone morphogenic protein/MIC-1 expression in LNCaP prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 2005; 280(19): 18636–18642.
- 21 Yoshioka H, Kamitani H, Watanabe T, Eling TE. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1/GDF15) expression is increased by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *J Biol Chem* 2008; 283(48): 33129–33137.
- 22 Kadowaki M, Yoshioka H, Kamitani H, Watanabe T, Wade PA, Eling TE. DNA methylation-mediated silencing of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1/GDF15) in glioma cell lines. *Int J Cancer* 2012; 130(2): 267–277.
- 23 Stone A, Valdes-Mora F, Gee JM, Farrow L, McClelland RA, Fiegl H, Dutkowski C, McCloy RA, Sutherland RL, Musgrove EA, Nicholson RI. Tamoxifen-induced epigenetic silencing of oestrogen-regulated genes in anti-hormone resistant breast cancer. *PLoS One* 2012; 7(7): e40466.
- 24 Brown DA, Lindmark F, Stattin P, Balter K, Adami HO, Zheng SL, Xu J, Isaacs WB, Gronberg H, Breit SN, Wiklund FE. Macrophage inhibitory cytokine 1: a new prognostic marker in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(21): 6658–6664.
- 25 Nakamura T, Scorilas A, Stephan C, Yousef GM, Kristiansen G, Jung K, Diamandis EP. Quantitative analysis of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) gene expression in human prostatic tissues. *Br J Cancer* 2003; 88(7): 1101–1104.
- 26 Lee J, Fricke F, Warnken U, Schnolzer M, Kopitz J, Gebert J. Reconstitution of TGFBR2-mediated signaling causes upregulation of GDF-15 in HCT116 colorectal cancer cells. *PLoS One* 2015; 10(6): e0131506.
- 27 Fisher OM, Levert-Mignon AJ, Lord SJ, Lee-Ng KK, Botelho NK, Falkenback D, Thomas ML, Bobryshev YV, Whiteman DC, Brown DA, Breit SN, Lord RV. MIC-1/GDF15 in Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2015; 112(8): 1384–1391.
- 28 Shnaper S, Desbaillets I, Brown DA, Murat A, Migliavacca E, Schluep M, Ostermann S, Hamou MF, Stupp R, Breit SN, de Tribolet N, Hegi ME. Elevated levels of MIC-1/GDF15 in the cerebrospinal fluid of patients are associated with glioblastoma and worse outcome. *Int J Cancer* 2009; 125(11): 2624–2630.
- 29 Bottner M, Suter-Crazzolaro C, Schober A, Unsicker K. Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues. *Cell Tissue Res* 1999; 297(1): 103–110.
- 30 Schober A, Bottner M, Strelau J, Kinscherf R, Bonaterra GA, Barth M, Schilling L, Fairlie WD, Breit SN, Unsicker K. Expression of growth differentiation factor-15/ macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in the perinatal, adult, and injured rat brain. *J Comp Neurol* 2001; 439(1): 32–45.
- 31 Hsiao EC, Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, Sebald SM, Huynh TV, Lee SJ. Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury. *Mol Cell Biol* 2000; 20(10): 3742–3751.
- 32 Krieg AJ, Rankin EB, Chan D, Razorenova O, Fernandez S, Giaccia AJ. Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia-inducible factor 1 alpha enhances hypoxic gene

- expression and tumor growth. *Mol Cell Biol* 2010; 30(1): 344–353.
- 33 Ilhan HD, Bilgin AB, Toyulu A, Dogan ME, Apaydin KC. The expression of GDF-15 in the human vitreous in the presence of retinal pathologies with an inflammatory component. *Ocul Immunol Inflamm* 2016; 24(2): 178–183.
 - 34 Akiyama M, Okano K, Fukada Y, Okano T. Macrophage inhibitory cytokine MIC-1 is upregulated by short-wave-length light in cultured normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett* 2009; 583(5): 933–937.
 - 35 Charalambous P, Wang X, Thanos S, Schober A, Unsicker K. Regulation and effects of GDF-15 in the retina following optic nerve crush. *Cell Tissue Res* 2013; 353(1): 1–8.
 - 36 Mehta RS, Chong DQ, Song M, Meyerhardt JA, Ng K, Nishihara R, Qian Z, Morikawa T, Wu K, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S, Chan AT. Association between plasma levels of macrophage inhibitory cytokine-1 before diagnosis of colorectal cancer and mortality. *Gastroenterology* 2015; 149(3): 614–622.
 - 37 Hagström E, James SK, Bertilsson M, Becker RC, Himmelmann A, Husted S, Katus HA, Steg PG, Storey RF, Siegbahn A, Wallentin L; PLATO Investigators. Growth differentiation factor-15 level predicts major bleeding and cardiovascular events in patients with acute coronary syndromes: results from the PLATO study. *Eur Heart J* 2016; 37(16): 1325–1333.
 - 38 Moore AG, Brown DA, Fairlie WD, Bauskin AR, Brown PK, Munier ML, Russell PK, Salamonsen LA, Wallace EM, Breit SN. The transforming growth factor- β superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(12): 4781–4788.
 - 39 Brown DA, Breit SN, Buring J, Fairlie WD, Bauskin AR, Liu T, Ridker PM. Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study. *Lancet* 2002; 359(9324): 2159–2163.
 - 40 Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113(6): 685–700.
 - 41 Mu Y, Gudey SK, Landstrom M. Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res* 2012; 347(1): 11–20.
 - 42 Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 2003; 425(6958): 577–584.
 - 43 Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Klevitsky R, Hewett TE, Breit SN, Molkentin JD. GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ Res* 2006; 98(3): 342–350.
 - 44 Bloch SA, Lee JY, Syburra T, Rosendahl U, Griffiths MJ, Kemp PR, Polkey MI. Increased expression of GDF-15 may mediate ICU-acquired weakness by down-regulating muscle microRNAs. *Thorax* 2015; 70(3): 219–228.
 - 45 Griner SE, Joshi JP, Nahta R. Growth differentiation factor 15 stimulates rapamycin-sensitive ovarian cancer cell growth and invasion. *Biochem Pharmacol* 2013; 85(1): 46–58.
 - 46 Subramaniam S, Strelau J, Unsicker K. Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways. *J Biol Chem* 2003; 278(11): 8904–8912.
 - 47 Johnen H, Lin S, Kuffner T, Brown DA, Tsai VW, Bauskin AR, Wu L, Pankhurst G, Jiang L, Junankar S, Hunter M, Fairlie WD, Lee NJ, Enriquez RF, Baldock PA, Corey E, Apple FS, Murakami MM, Lin EJ, Wang C, During MJ, Sainsbury A, Herzog H, Breit SN. Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF- β superfamily cytokine MIC-1. *Nat Med* 2007; 13(11): 1333–1340.
 - 48 Wang CY, Huang AQ, Zhou MH, Mei YA. GDF15 regulates Kv2.1-mediated outward K⁺ current through the Akt/mTOR signalling pathway in rat cerebellar granule cells. *Biochem J* 2014; 460(1): 35–47.
 - 49 Lu JM, Wang CY, Hu C, Fang YJ, Mei YA. GDF-15 enhances intracellular Ca²⁺ by increasing Cav1.3 expression in rat cerebellar granule neurons. *Biochem J* 2016; 473(13): 1895–1904.
 - 50 Liu DD, Lu JM, Zhao QR, Hu C, Mei YA. Growth differentiation factor-15 promotes glutamate release in medial prefrontal cortex of mice through upregulation of T-type calcium channels. *Sci Rep* 2016; 6: 28653.
 - 51 Carrillo-Garcia C, Prochnow S, Simeonova IK, Strelau J, Holzl-Wenig G, Mandl C, Unsicker K, von Bohlen Und Halbach O, Ciccolini F. Growth/differentiation factor 15 promotes EGFR signalling, and regulates proliferation and migration in the hippocampus of neonatal and young adult mice. *Development* 2014; 141(4): 773–783.
 - 52 Strelau J, Sullivan A, Bottner M, Lingor P, Falkenstein E, Suter-Crazzolara C, Galter D, Jasza J, Kriegstein K, Unsicker K. Growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 is a novel trophic factor for midbrain dopaminergic neurons *in vivo*. *J Neurosci* 2000; 20(23): 8597–8603.
 - 53 Strelau J, Strzelczyk A, Rusu P, Bendner G, Wiese S, Diella F, Altick AL, von Bartheld CS, Klein R, Sendtner M, Unsicker K. Progressive postnatal motoneuron loss in mice lacking GDF-15. *J Neurosci* 2009; 29(43): 13640–13648.
 - 54 Schindowski K, von Bohlen und Halbach O, Strelau J, Ridder DA, Herrmann O, Schober A, Schwaninger M, Unsicker K. Regulation of GDF-15, a distant TGF- β superfamily

- member, in a mouse model of cerebral ischemia. *Cell Tissue Res* 2011; 343(2): 399–409.
- 55 Worthmann H, Kempf T, Widera C, Tryc AB, Goldbecker A, Ma YT, Deb M, Tountopoulou A, Lambrecht J, Heeren M, Lichtinghagen R, Wollert KC, Weissenborn K. Growth differentiation factor 15 plasma levels and outcome after ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2011; 32(1): 72–78.
 - 56 Wang X, Krebbers J, Charalambous P, Machado V, Schober A, Bosse F, Muller HW, Unsicker K. Growth/differentiation factor-15 and its role in peripheral nervous system lesion and regeneration. *Cell Tissue Res* 2015; 362(2): 317–330.
 - 57 Machado V, Haas SJ, von Bohlen Und Halbach O, Wree A, Kriegelstein K, Unsicker K, Spittau B. Growth/differentiation factor-15 deficiency compromises dopaminergic neuron survival and microglial response in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2015; 88: 1–15.
 - 58 Strelau J, Schober A, Sullivan A, Schilling L, Unsicker K. Growth/differentiation factor-15 (GDF-15), a novel member of the TGF-beta superfamily, promotes survival of lesioned mesencephalic dopaminergic neurons *in vitro* and *in vivo* and is induced in neurons following cortical lesioning. *J Neural Transm Suppl* 2003; (65): 197–203.
 - 59 Kim DH, Lee D, Chang EH, Kim JH, Hwang JW, Kim JY, Kyung JW, Kim SH, Oh JS, Shim SM, Na DL, Oh W, Chang JW. GDF-15 secreted from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells delivered through the cerebrospinal fluid promotes hippocampal neurogenesis and synaptic activity in an Alzheimer's disease model. *Stem Cells Dev* 2015; 24(20): 2378–2390.
 - 60 Mensching L, Borger AK, Wang X, Charalambous P, Unsicker K, Haastert-Talini K. Local substitution of GDF-15 improves axonal and sensory recovery after peripheral nerve injury. *Cell Tissue Res* 2012; 350(2): 225–238.
 - 61 Yi MH, Zhang E, Baek H, Kim S, Shin N, Kang JW, Lee S, Oh SH, Kim DW. Growth differentiation factor 15 expression in astrocytes after excitotoxic lesion in the mouse hippocampus. *Exp Neurobiol* 2015; 24 (2): 133–138.
 - 62 Strelau J, Schmeer C, Peterziel H, Sackmann T, Herold-Mende C, Steiner H, Weller M, Unsicker K. Expression and putative functions of GDF-15, a member of the TGF-beta superfamily, in human glioma and glioblastoma cell lines. *Cancer Lett* 2008; 270 (1): 30–39.
 - 63 Roth P, Junker M, Tritschler I, Mittelbronn M, Dombrowski Y, Breit SN, Tabatabai G, Wick W, Weller M, Wischhusen J. GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas. *Clin Cancer Res* 2010; 16(15): 3851–3859.
 - 64 Tsai VW, Manandhar R, Jorgensen SB, Lee-Ng KK, Zhang HP, Marquis CP, Jiang L, Husaini Y, Lin S, Sainsbury A, Sawchenko PE, Brown DA, Breit SN. The anorectic actions of the TGFbeta cytokine MIC-1/GDF15 require an intact brainstem area postrema and nucleus of the solitary tract. *PLoS One* 2014; 9 (6): e100370.
 - 65 Fuchs T, Trollor JN, Crawford J, Brown DA, Baune BT, Samaras K, Campbell L, Breit SN, Brodaty H, Sachdev P, Smith E. Macrophage inhibitory cytokine-1 is associated with cognitive impairment and predicts cognitive decline - the Sydney Memory and Aging Study. *Aging Cell* 2013; 12(5): 882–889.
 - 66 Lindahl B. The story of growth differentiation factor 15: another piece of the puzzle. *Clin Chem* 2013; 59(11): 1550–1552.
 - 67 Wallentin L, Hijazi Z, Andersson U, Alexander JH, De Caterina R, Hanna M, Horowitz JD, Hylek EM, Lopes RD, Asberg S, Granger CB, Siegbahn A, ARISTOTLE Investigators. Growth differentiation factor 15, a marker of oxidative stress and inflammation, for risk assessment in patients with atrial fibrillation: insights from the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) trial. *Circulation* 2014; 130(21): 1847–1858.
 - 68 Wollert KC, Kempf T. Growth differentiation factor 15 in heart failure: an update. *Curr Heart Fail Rep* 2012; 9(4): 337–345.
 - 69 Xue H, Fu Z, Chen Y, Xing Y, Liu J, Zhu H, Zhou X. The association of growth differentiation factor-15 with left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *PLoS One* 2012; 7(10): e46534.
 - 70 Hanatani S, Izumiya Y, Takashio S, Kojima S, Yamamuro M, Araki S, Rokutanda T, Tsujita K, Yamamoto E, Tanaka T, Tayama S, Kaikita K, Hokimoto S, Sugiyama S, Ogawa H. Growth differentiation factor 15 can distinguish between hypertrophic cardiomyopathy and hypertensive hearts. *Heart Vessels* 2014; 29(2): 231–237.
 - 71 Wollert KC, Kempf T, Peter T, Olofsson S, James S, Johnston N, Lindahl B, Horn-Wichmann R, Brabant G, Simoons ML, Armstrong PW, Califf RM, Drexler H, Wallentin L. Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation* 2007; 115(8): 962–971.
 - 72 Kempf T, Wollert KC. Growth differentiation factor-15: a new biomarker in cardiovascular disease. *Herz* 2009; 34(8): 594–599.
 - 73 Wollert KC, Kempf T, Lagerqvist B, Lindahl B, Olofsson S, Allhoff T, Peter T, Siegbahn A, Venge P, Drexler H, Wallentin L. Growth differentiation factor 15 for risk stratification and selection of an invasive treatment strategy in non ST-eleva-

- tion acute coronary syndrome. *Circulation* 2007; 116(14): 1540–1548.
- 74 Anand IS, Kempf T, Rector TS, Tapken H, Allhoff T, Jantzen F, Kuskowski M, Cohn JN, Drexler H, Wollert KC. Serial measurement of growth-differentiation factor-15 in heart failure: relation to disease severity and prognosis in the Valsartan Heart Failure Trial. *Circulation* 2010; 122(14): 1387–1395.
 - 75 Santhanakrishnan R, Chong JP, Ng TP, Ling LH, Sim D, Leong KT, Yeo PS, Ong HY, Jaufeerally F, Wong R, Chai P, Low AF, Richards AM, Lam CS. Growth differentiation factor 15, ST2, high-sensitivity troponin T, and N-terminal pro brain natriuretic peptide in heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 2012; 14(12): 1338–1347.
 - 76 Euler-Taimor G, Heger J. The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2006; 69(1): 15–25.
 - 77 Jurczyk J, Brown D, Stanley KK. Polarised secretion of cytokines in primary human microvascular endothelial cells is not dependent on N-linked glycosylation. *Cell Biol Int* 2003; 27(12): 997–1003.
 - 78 Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res* 2002; 91(9): 776–781.
 - 79 Xu XY, Nie Y, Wang FF, Bai Y, Lv ZZ, Zhang YY, Li ZJ, Gao W. Growth differentiation factor (GDF)-15 blocks norepinephrine-induced myocardial hypertrophy via a novel pathway involving inhibition of epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 2014; 289(14): 10084–10094.
 - 80 Bonaterra GA, Zugel S, Thogersen J, Walter SA, Haberkorn U, Strelau J, Kinscherf R. Growth differentiation factor-15 deficiency inhibits atherosclerosis progression by regulating interleukin-6-dependent inflammatory response to vascular injury. *J Am Heart Assoc* 2012; 1(6): e002550.
 - 81 Ding Q, Mracek T, Gonzalez-Muniesa P, Kos K, Wilding J, Trayhurn P, Bing C. Identification of macrophage inhibitory cytokine-1 in adipose tissue and its secretion as an adipokine by human adipocytes. *Endocrinology* 2009; 150(4): 1688–1696.
 - 82 Huh SJ, Chung CY, Sharma A, Robertson GP. Macrophage inhibitory cytokine-1 regulates melanoma vascular development. *Am J Pathol* 2010; 176(6): 2948–2957.
 - 83 Schlittenhardt D, Schober A, Strelau J, Bonaterra GA, Schmiedt W, Unsicker K, Metz J, Kinscherf R. Involvement of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in oxLDL-induced apoptosis of human macrophages *in vitro* and in arteriosclerotic lesions. *Cell Tissue Res* 2004; 318(2): 325–333.
 - 84 de Jager SC, Bermudez B, Bot I, Koenen RR, Bot M, Kavelaars A, de Waard V, Heijnen CJ, Muriana FJ, Weber C, van Berkel TJ, Kuiper J, Lee SJ, Abia R, Biessen EA. Growth differentiation factor 15 deficiency protects against atherosclerosis by attenuating CCR2-mediated macrophage chemotaxis. *J Exp Med* 2011; 208(2): 217–225.
 - 85 Kempf T, Zarbock A, Widera C, Butz S, Stadtmann A, Rossaint J, Bolomini-Vittori M, Korf-Klingebiel M, Napp LC, Hansen B, Kanwischer A, Bavendiek U, Beutel G, Hapke M, Sauer MG, Laudanna C, Hogg N, Vestweber D, Wollert KC. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat Med* 2011; 17(5): 581–588.
 - 86 Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, Tongers J, Heineke J, Kotlarz D, Xu J, Molkentin JD, Niessen HW, Drexler H, Wollert KC. The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2006; 98(3): 351–360.
 - 87 Kluger HM, Hoyt K, Bacchiocchi A, Mayer T, Kirsch J, Kluger Y, Sznol M, Ariyan S, Molinaro A, Halaban R. Plasma markers for identifying patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17(8): 2417–2425.
 - 88 Zhao L, Lee BY, Brown DA, Molloy MP, Marx GM, Pavlakis N, Boyer MJ, Stockler MR, Kaplan W, Breit SN, Sutherland RL, Henshall SM, Horvath LG. Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling. *Cancer Res* 2009; 69(19): 7696–7703.
 - 89 Zhang Y, Hua W, Niu LC, Li SM, Wang YM, Shang L, Zhang C, Li WN, Wang R, Chen BL, Xin XY, Zhang YQ, Wang J. Elevated growth differentiation factor 15 expression predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Tumour Biol* 2016; 37(7): 9423–9431.
 - 90 Mimeault M, Batra SK. Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer. *J Cell Physiol* 2010; 224(3): 626–635.
 - 91 Albertoni M, Shaw PH, Nozaki M, Godard S, Tenan M, Hamou ME, Fairlie DW, Breit SN, Paralkar VM, de Tribolet N, Van Meir EG, Hegi ME. Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene* 2002; 21(27): 4212–4219.
 - 92 Eling TE, Baek SJ, Shim M, Lee CH. NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39(6): 649–655.
 - 93 Baek SJ, Okazaki R, Lee SH, Martinez J, Kim JS, Yamaguchi K, Mishina Y, Martin DW, Shoieb A, McEntee MF, Eling TE. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1

- over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia. *Gastroenterology* 2006; 131(5): 1553–1560.
- 94 Zimmers TA, Gutierrez JC, Koniaris LG. Loss of GDF-15 abolishes sulindac chemoprevention in the ApcMin/+ mouse model of intestinal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136 (4): 571–576.
- 95 Cekanova M, Lee SH, Donnell RL, Sukhthankar M, Eling TE, Fischer SM, Baek SJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 expression inhibits urethane-induced pulmonary tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2(5): 450–458.
- 96 Husaini Y, Qiu MR, Lockwood GP, Luo XW, Shang P, Kuffner T, Tsai VW, Jiang L, Russell PJ, Brown DA, Breit SN. Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) slows cancer development but increases metastases in TRAMP prostate cancer prone mice. *PLoS One* 2012; 7(8): e43833.
- 97 Senapati S, Rachagani S, Chaudhary K, Johansson SL, Singh RK, Batra SK. Overexpression of macrophage inhibitory cytokine-1 induces metastasis of human prostate cancer cells through the FAK-RhoA signaling pathway. *Oncogene* 2010; 29(9): 1293–1302.
- 98 Codo P, Weller M, Kaulich K, Schraivogel D, Silginer M, Reifenberger G, Meister G, Roth P. Control of glioma cell migration and invasiveness by GDF-15. *Oncotarget* 2016; 7(7): 7732–7746.
- 99 Kim KK, Lee JJ, Yang Y, You KH, Lee JH. Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29(4): 704–712.