

## 人白介素 24 重组蛋白的表达及其抗肿瘤机理的研究

# The Expression of Recombinant Protein of Human Interleukin-24 and its Anti-tumor Mechanism

叶震敏<sup>1</sup> 朱晔涵<sup>2</sup> 盛伟华<sup>1</sup> 缪竞诚<sup>1</sup> 危少华<sup>2</sup> 吴 康<sup>1</sup> 杨吉成<sup>1\*</sup>

YE Zhen-Min<sup>1</sup> ,ZHU Ye-Han<sup>2</sup> , SHENG Wei-Hua<sup>1</sup> , MIAO Jing-Cheng<sup>1</sup> , WEI Shao-Hua<sup>2</sup> , WU Kang<sup>1</sup>  
and YANG Ji-Cheng<sup>1\*</sup>

1. 苏州大学医学院细胞与分子生物学教研室 苏州 215007

2. 苏州大学附属第一人民医院 苏州 215007

1. Cell and Molecular Biology Institute ,College of Medicine ,SooChow University , Suzhou 215007 , China

2. The First Affiliated Hospital of SooChow University , Suzhou 215007 ,China

**摘 要** 将人白细胞介素 24(hIL-24)的 cDNA 序列克隆至原核高效表达载体 pET-21a(+)上,经 IPTG 诱导后,在大肠杆菌中获高效表达。经纯化、复性后的 rhIL-24 蛋白具有抑制 HeLa 细胞生长,诱导 HeLa 细胞凋亡,刺激外周血单核细胞分泌 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ ,抑制血管形成的功能。初探了 rhIL-24 蛋白能通过下调抗凋亡因子 bcl-2 表达,激活线粒体凋亡途径引起肿瘤细胞凋亡的机理。

**关键词** 人白介素 24 重组蛋白,HeLa 细胞,抗肿瘤机理

中图分类号 Q291;Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0719-06

**Abstract** The hIL24 cDNA sequence was cloned into prokaryotic high expressive vector pET-21a(+) and recombinant hIL24 was expressed in *E. coli* with IPTG induction. The purified recombinant hIL24 exhibits following functions in HeLa cell: inhibiting cell growth, inducing apoptosis, inducing PMBC to secrete IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and inhibiting blood vessel formation. Our preliminary results suggest that the apoptosis induced by rhIL24 is through down-regulating expression of anti-apoptosis factor Bcl-2 and activation of mitochondria apoptosis pathway.

**Key words** recombinant human IL24 protein, HeLa cell, anti-tumor mechanism

白细胞介素 24(Interleukin-24, IL-24),又名黑色素瘤分化相关抗原 7(melanoma differentiation-associated antigen, MDA-7)是 1995 年 Jiang H 等人利用减数杂交技术从  $\beta$ -干扰素(IFN- $\beta$ )和蛋白激酶激活剂 MEZ 诱导分化的人恶性黑色素瘤细胞 HO-1 中克隆的新基因<sup>[1]</sup>。人 IL-24 具有广谱抗肿瘤活性,对多种组织来源的肿瘤细胞均具有显著的生长抑制效

应和诱导凋亡的作用,而对正常细胞没有影响<sup>[2,3]</sup>。IL-24 还具有诱导外周血单核细胞分泌 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12 等具有抗肿瘤活性的二级细胞因子的功能,IL-24 基因是目前发现的唯一一个既抑制肿瘤细胞生长和血管形成并诱导肿瘤细胞凋亡,同时又刺激表达细胞因子的基因<sup>[4]</sup>。目前, P53、P10、Rb 等抑癌基因正在用于基因疗法的临床试验,均不具有通

Received: April 4, 2005; Accepted: May 24, 2005.

The work was supported by a grant from Medical Developing Fundation of SooChow University( No. EE134517 ).

\* Corresponding author. Tel: 86-512-65125030; E-mail: jeyang@suda.edu.cn

苏州大学医学发展基金资助项目( No. EE134517 ).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

过刺激免疫应答来发挥抗肿瘤的活性。因此对 IL-24 基因表达产物的功能性研究具有非常重要的理论和临床意义<sup>[5]</sup>。国外的研究多为构建 IL-24 的腺病毒载体进行基因治疗,而对 IL-24 的原核表达的蛋白产物进行抗肿瘤功能的研究未见报道,原核表达可获得大量具有生物学活性的重组蛋白,并且可以进一步开发为基因重组药物。因此我们构建了高效原核表达载体 pET-21a(+)-IL-24,实现了在大肠杆菌中高效表达,并证明纯化复性的 rhIL-24 蛋白,不仅对人宫颈癌细胞(HeLa 细胞)具有生长抑制和诱导凋亡的功能,而且能刺激外周血单核细胞分泌 IL-6、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ ,也能抑制鸡胚绒毛尿囊膜毛细血管的形成,还进一步探讨了 rhIL-24 蛋白可通过下调抗凋亡因子 bcl-2,激活线粒体凋亡途径而引起细胞凋亡的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pBV220-IL-24 载体、*E. coli* 菌株 DH5 $\alpha$ , BL-21、HeLa 细胞为本室保存, pET-21a(+ )载体购自晶美公司, BamH I 和 Xho I 购自 TaKaRa 公司, T4 DNA 连接酶购自 MBI 公司, Taq DNA 聚合酶购自上海申能博彩生物技术有限公司, 山羊抗人 mda-7(C-16) 抗体购自 Santa Cruz 公司, 生物素标记的兔抗山羊 IgG 购自 AnasSpec 公司, 亲和素标记碱性磷酸酶(avidin-AP), NBT/BCIP 染色试剂盒均购自 Sino-American Biotechnology Co., 细胞凋亡染色试剂盒购自碧云天公司, 鼠抗人 bcl-2 抗体和兔抗人的 Caspase3 抗体均为 Santa Cruz 公司产品, S-P 试剂盒为福州迈新公司产品, IL-6、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的 ELISA 检测试剂盒购自晶美公司, 鸡胚购自苏州孵化场。

### 1.2 方法

**1.2.1 重组质粒 pET-21a-IL24 的构建和鉴定:** 以本室构建的 pBV220-IL-24 载体为模板, 以上游含有 BamH I 酶切位点, 下游含有 Xho I 酶切位点的 hIL-24 引物进行 PCR 扩增(引物由上海生工合成), 将 pET-21a(+ )质粒和 PCR 产物双酶切后用胶回收试剂盒回收目的片段, 再由 T4 DNA 连接酶 4 $^{\circ}$ C 连接过夜, 氯化钙法转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, PCR 鉴定重组子后测序。将测序正确的 pET-21a(+ )-IL-24 重组质粒抽提后转化 BL21 菌株, 挑取阳性克隆。

**1.2.2 rhIL-24 表达产物的诱导与复性:** 挑取阳性克隆, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。按 1:50 接种 LA 培养基(LB + Amp)继续振荡培养至 OD<sub>600</sub>  $\approx$  0.4 时, 加入 IPTG (终浓度为 1mmol/L), 经诱导不同时间(2、3、4、5h)

后, 分别取样, 离心取菌体, 超声破碎, 按本室常规进行洗涤, 溶包, 复性后透析, 获得部分纯化 rhIL-24 蛋白, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.3 rhIL-24 蛋白的鉴定:** 样品经 15% SDS-PAGE 电泳, 鉴定表达产物分子量。SDS-PAGE 凝胶经 180mA 电转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 取 NC 膜用 5% 脱脂乳封闭, pH7.4 10mmol/L PBST 洗涤; 山羊抗人 IL-24 抗体孵育, pH7.4 10mmol/L PBST 洗涤; 兔抗山羊生物素标记的 IgG 孵育, pH8.0 10mmol/L TBST 洗涤; 经亲和素标记的碱性磷酸酶孵育, pH8.0 10mmol/L TBST 洗涤, 加 NBT/BCIP 底物显色。

**1.2.4 rhIL-24 蛋白对 HeLa 细胞的生长抑制:** 将呈指数生长期的 HeLa 细胞, 胰酶消化后, 制成细胞悬液, 计数后按每孔  $5 \times 10^3$  个/100 $\mu$ L 接种 96 孔板, 细胞贴壁 4~6h 后, 每孔加入 10 $\mu$ L 部分纯化 rhIL-24 蛋白, 以此为 0 时相, 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1~5d, 在不同时间观察细胞形态变化和生长繁殖状况, 同时设有 1mg/mL 阿霉素和 PBS 的阳性和阴性对照。在每隔 24h 加 10 $\mu$ L MTI(5mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 下继续培养 4h 后再加入 10% SDS-HCl 终止液 100 $\mu$ L/孔。于 37 $^{\circ}$ C 充分溶解 12h 后, 在酶标仪上测定 570nm 下的 A 值, 以 A 值为纵坐标, 时间(D)为横坐标绘制生长曲线。按以下公式计算抑制率, 根据抑制率变化趋向, 得到抑制率变化函数。统计学分析用 SAS 软件进行方差检验。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{空白对照组 A 值} - \text{实验组 A 值}}{\text{空白对照组 A 值}} \times 100\%$$

**1.2.5 Hoechst 染色检测 HeLa 细胞凋亡形态:** 将呈指数生长期的 HeLa 细胞, 胰酶消化后, 制成细胞悬液, 取 1mL 接种置有 1.0cm  $\times$  1.0cm 载玻片的 6 孔板内, 细胞爬片培养 4~6h 后, 实验组每孔加入 100 $\mu$ L rhIL-24 蛋白, 对照组加入 100 $\mu$ L pH7.4 10mmol/L PBS, 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72h 后, 吸取上清, 取出玻片, pH7.4 10mmol/L PBS 洗涤 2 次后, 按 Hoechst 染色试剂盒说明书进行固定、染色, 封片后在荧光显微镜下检测细胞凋亡状况。

**1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率:** 按与 1.2.5 相同的方法处理细胞, 将细胞接种到大方瓶中, 待 70% 细胞贴壁后换成无血清培养基, 同时按上述方法设置实验组与对照组, 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72h 后, 用 pH7.4 10mmol/L PBS 洗涤, 70% 冷乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定 24h 以上, 流式细胞仪检测凋亡峰(sub-G1 峰)和细胞凋亡率。

**1.2.7 免疫细胞化学分析 rhIL-24 对抗凋亡因子的影响:** 按与 1.2.5 相同的方法处理 HeLa 细胞, 并设

置实验组与对照组, 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72h 后, 取出玻片, pH7.4 10mmol/L PBS 洗涤 2 次, 丙酮固定后, 分别用 bcl-2 和 Caspase3 的免疫组化试剂盒, 按说明书进行检测。显微镜下记数阳性率(每 10 个细胞中阳性细胞数为一个样本), 用 SAS 统计软件包作 *t* 检验 ( $n = 20$ )。

**1.2.8 rhIL-24 蛋白免疫刺激活性检测:** 取全血, 用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞, 置于 6 孔板中培养, 分别设置对照组与实验组, 实验组中加 rhIL-24 蛋白 10 $\mu$ L(1mg/mL), 对照组加入 PBS, 培养 48h、72h 取上清, 按 IL-6、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的 ELISA 检测试剂盒说明书进行检测, 在酶标仪下测定 450nm 吸光值。

**1.2.9 rhIL-24 蛋白抑制血管形成的功能:** 取 30 只孵化 8d 的鸡胚, 随机分为 3 组, 每组 10 只, 无菌打开气室后, 揭开鸡胚壳内膜, 分别将 PBS(阴性对照)、rhIL-24(250 $\mu$ g/mL)、平阳霉素(阳性对照 5 $\mu$ g/mL) 滴加在鸡胚的绒毛尿囊膜上, 用 Co60 灭菌的胶带密封开口, 再继续孵化 3 天, 打开气室, 取绒毛尿囊膜固定在载玻片上, 对血管进行分类, 主干血管定为一二级血管, 主干血管上的分支血管定为二级血管, 二级血管以下的分支定为散三级血管, 统计各级血管数, 每个样本大小为 1.5cm  $\times$  1.5cm。用 SPSS 统计软件做独立样本 *t* 检验 ( $n = 10$ )。

## 2 结果

### 2.1 pET-21a-IL24 重组表达质粒的构建

构建的 pET-21a-IL24 重组表达质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切和 PCR 方法鉴定的阳性重组子 DNA 与预期的 IL-24 基因片段(474bp)大小一致(图 1)。

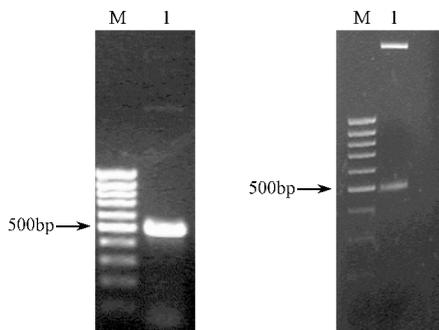


图 1 pET-21a(+)-IL24 重组质粒的鉴定  
Fig. 1 Identification of recombinant expression plasmid pET-21a(+)-IL24

M: DNA marker: 100bp ladder; 1: PCR product(mature peptide);  
2: digestion fragment (*Bam*H I + *Xho* I).

### 2.2 rhIL-24 蛋白的鉴定

用 IPTG 诱导表达的菌体裂解后, 通过 15% SDS-PAGE 电泳, 经 Bio-Rad 图像系统分析, 有明显的 18.5kD 左右的蛋白条带呈现, 与预期理论值一致。(图 2A) 经 Western-blotting 检测在相同位置显现 rhIL-24 蛋白的阳性条带(图 2B)。

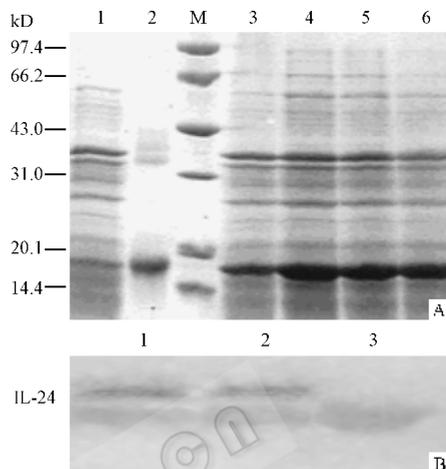


图 2 表达纯化 rhIL-24 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析  
Fig. 2 SDS-PAGE and Western-blotting analysis of expressed and purified rhIL-24 protein

(A) SDS-PAGE. 1: expressed control protein; 2: purified IL-24 protein; M: protein standard marker; 3: expressed inclusion body(2h); 4: expressed inclusion body(3h); 5: expressed inclusion body(4h); 6: expressed inclusion body(5h). (B) Western-blotting 1: purified IL-24 protein; 2: expressed inclusion body(4h); 3: expressed control protein.

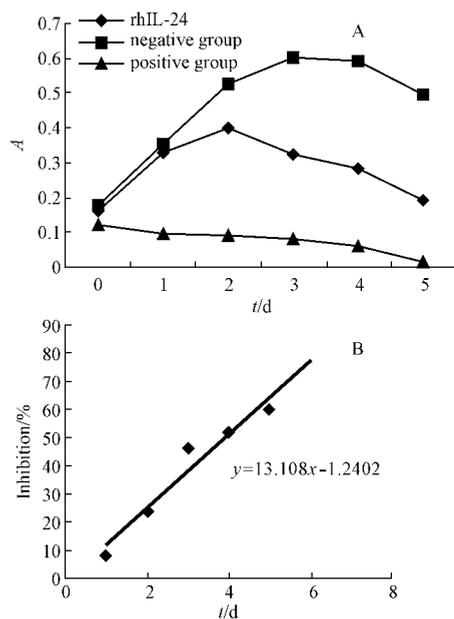


图 3 rhIL-24 蛋白对 HeLa 细胞生长的抑制  
Fig. 3 The inhibition of rhIL-24 protein

on HeLa cells growth

### 2.3 rhIL-24 蛋白对 HeLa 细胞的生长抑制

纯化的 rhIL-24 蛋白与 HeLa 细胞共同孵育 120h, MTT 法检测不同时间 rhIL-24 蛋白对 HeLa 细胞生长的抑制状况, 结果 rhIL-24 蛋白对 HeLa 细胞的生长抑制呈时间依赖性, 并在 48h 后抑制效应明显, 并且实验组与阴性对照组间相比有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 3A)。按公式计算生长抑制率, 绘制抑制率趋向函数(图 3B)。

### 2.4 rhIL-24 蛋白诱导 HeLa 细胞凋亡的检测

纯化的 rhIL-24 蛋白与 HeLa 细胞共同孵育 72h 后, 在显微镜下可观察到的细胞凋亡的形态学特征。用 Hoechst 染色和流式细胞仪检测 HeLa 细胞凋亡状况。Hoechst 染色后, 经 rhIL-24 蛋白处理的 HeLa 细胞在荧光显微镜下可观察到明显的核浓缩。流式细胞仪检测处理组与对照组的 HeLa 细胞, 其凋亡细胞率分别为 25.7% 和 0% (图 4)。证明 rhIL-24 蛋白能明显引起 HeLa 细胞凋亡。

图 4 rhIL-24 蛋白诱导 HeLa 细胞凋亡

Fig. 4 The apoptosis-inducing effect of rhIL-24 protein on HeLa cells

a: the normal HeLa cells; b: the HeLa cells treated with rhIL-24 protein; c: hoechst staining of normal HeLa cells; d: hoechst staining of HeLa cells treated with rhIL-24; e: the flow cytometry map of normal HeLa cells; f: the flow cytometry map of HeLa cells treated with rhIL-24.

### 2.5 rhIL-24 蛋白对抗凋亡因子的影响

经 bcl-2 和 Caspase-3 免疫组化检测试剂盒检测, 表明 rhIL-24 蛋白显著抑制 bcl-2 的表达, 而对 Caspase-3 的表达影响不明显。对照组的 bcl-2 的阳性率明显高于 rhIL-24 处理组 (\*\* 表示  $P < 0.01$ ), 尽管对照组与处理组之间的 Caspase-3 有差异, 但无统计学意义(图 5)。

### 2.6 rhIL-24 蛋白的免疫刺激活性

本文测定了 rhIL-24 蛋白对外周血淋巴细胞的免疫刺激活性, 对 PMBC 的上清用 IL-6、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的 ELISA 检测试剂盒检测, 结果发现在 rhIL-24 蛋白中孵育的 PMBC 在 48h 和 72h 的上清与对照组比较, IL-6、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  浓度差异显著 (\* 表示  $P < 0.05$ )。其中, IL-6 与 IFN- $\gamma$  在 72h 的差异极显著 (\*\* 表示  $P < 0.01$ ) (图 6)。

### 2.7 rhIL-24 蛋白抑制血管形成

通过 rhIL-24 蛋白对鸡胚绒毛尿囊膜上毛细血

管的影响来研究其抑制血管形成的功能。结果发现 rhIL-24 蛋白与平阳霉素(阳性对照)均可显著抑制血管形成。其中对二级和三级血管的抑制效果明显, 与阴性组比较, 差异极显著 (\*\* 表示  $P < 0.01$ , \*\*\* 表示  $P < 0.001$ ) (图 7)。

## 3 讨论

目前的研究显示, IL-24 基因很可能是第一个既抑制肿瘤生长和血管形成又刺激免疫系统的基因<sup>[6]</sup>。鉴于国外多进行 IL-24 基因治疗和凋亡机理方面的研究, 而对 IL-24 的蛋白产物及抗血管形成功能方面的研究很少, 而重组蛋白具有应用方便、安全的特点, 本研究构建高效原核表达载体 pET-21a (+)-IL-24 获得了具有活性的 rhIL-24 重组蛋白, 通过 Western-blotting 检测尽管有非特异性条带, 但纯化的 rhIL-24 蛋白和诱导表达的产物均具有明显的特异性条带, 这可能与所选用的抗 IL-24 抗体不是

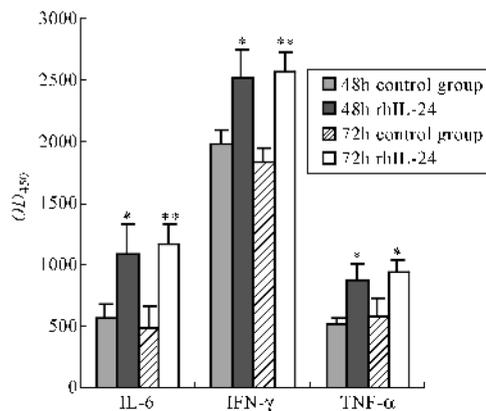


图 6 rhIL-24 蛋白对细胞因子分泌的诱导

Fig. 6 The inductive effect of rhIL-24 protein on cytokine

瘤细胞株生长抑制的时间反应敏感度明显不同。这可能与 rhIL-24 蛋白对不同肿瘤细胞株的敏感性不完全相同有关。

rhIL-24 蛋白可刺激外周血单核细胞分泌 Th1 型细胞因子 IL-6、TNF-α、IFN-γ,具有明显的免疫刺激功能,与报道一致<sup>[4]</sup>。IL-24 作为 IL-10 家族的新成员<sup>[8]</sup>,通过与 IL-10 的拮抗作用,诱导外周血单核细胞分泌 IL-6、TNF-α、IFN-γ 等免疫调节细胞因子,这些二级细胞因子可激活免疫系统对肿瘤抗原的应答,从而促进抗肿瘤免疫。

此外, rhIL-24 蛋白能抑制血管形成,而鸡胚绒毛尿囊膜的毛细血管抑制实验中, rhIL-24 蛋白与抗血管形成药物平阳霉素对二级以下的微血管产生显著抑制效果。平阳霉素作为临床上广泛应用的抑制血管瘤的药物,通过抑制血管内皮 DNA 合成,激活凝血、纤溶、补体及炎症免疫系统导致的血管的纤维化和血栓形成。关于 rhIL-24 蛋白抑制血管形成的研究还未见报道, JiYuan Chen 等曾报道 Ad-IL-24 可抑制表型正常但染色体畸变的鼠血管平滑肌细胞的迁移,而对正常人和小鼠的血管平滑肌细胞无影响<sup>[10]</sup>,对于 rhIL-24 蛋白对人血管瘤平滑肌细胞和

图 5 rhIL-24 蛋白对 HeLa 细胞 bcl-2 和 Caspase-3 的影响

Fig. 5 The effect of rhIL-24 protein on the expression of bcl-2 and Caspase-3 in HeLa cells

- A : the immunohistochemistry staining
- a. bcl-2 of cell treated with rhIL-24 , staining
- b. bcl-2 of control group
- c. Caspase-3 of cell treated with rhIL-24 , staining
- d. Caspase-3 of control group , staining

B : the statistical chart of expression of bcl-2 and Caspase-3

单克隆抗体有关,是否与 rhIL-24 蛋白纯度不够有关,还需进一步探索。

研究结果证明 rhIL-24 蛋白可明显抑制 HeLa 细胞的生长,诱导 HeLa 细胞凋亡,这与现有报道一致<sup>[7]</sup>。我们在研究中发现的 rhIL-24 蛋白对不同肿

图 7 rhIL-24 蛋白对血管生成的抑制效应

Fig. 7 The inhibitive effect of rhIL-24 protein on the formation of blood vessel

A : the blood vessel distribution ;

B : the graph showing the number of blood vessels

正常血管平滑肌细胞的迁移和生长是否有抑制作用,机理如何等问题还有待进一步研究。

实验结果表明 rhIL-24 蛋白可以显著降低 Bcl-2 蛋白表达量,激活线粒体凋亡途径而引起细胞凋亡<sup>[9]</sup>。根据现有对细胞凋亡途径的认识和 Bcl-2 家族蛋白的了解,可以基本确定 rhIL-24 通过以下途径诱导肿瘤细胞凋亡:rhIL-24 与膜受体后,与癌基因蛋白产物作用,改变细胞中促细胞凋亡蛋白(BAX, BAK)抗细胞凋亡蛋白(BCL2, BCL-XL)的比例,激活线粒体凋亡途径,再通过激活前体半胱氨酸蛋白酶(caspase),最终激活 DNA 裂解酶,引起染色体的分解而导致肿瘤细胞死亡<sup>[11,12]</sup>。在此途径中 Caspase-3 是一种促凋亡因子,可由半胱氨酸蛋白酶原活化变成小分子的有活性的酶,前后过程中量没有大的变化,因此免疫组化检测 rhIL-24 对 Caspase-3 表达量的作用时,变化不明显是正常的。

总之,通过研究我们可以确定 rhIL-24 蛋白具有与 IL-24 基因治疗相同的功能,既可通过抑制肿瘤血管形成来阻止肿瘤细胞浸润和转移,又可刺激免疫调节细胞因子分泌来发挥抗肿瘤免疫应答,尤其是 rhIL-24 蛋白还能通直接抑制肿瘤细胞生长和诱导肿瘤细胞凋亡直接发挥抗肿瘤效应。因此,我们有理由相信 rhIL-24 蛋白可开发成为一种理想的基因重组抗癌药物。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Jiang H, Lin JJ, Su ZZ *et al.* Subtraction hybridization identifies a novel melanoma-differentiation-associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene*, 1995, **11**: 2477 - 2486
- [ 2 ] Gazdar AF, Minna John D. Targeted therapies for killing tumor cells. *PNAS*, 2001, **98**: 10028 - 10030
- [ 3 ] Yacoub A, Mitchell C, Lister A *et al.* Melanoma differentiation-

associated 7 (interleukin 24) inhibits growth and enhances radiosensitivity of glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res*, 2003, **9**: 3272 - 3981

- [ 4 ] Caudell EG, Mimm JB, Poindexter N *et al.* The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL24. *J Immunol*, 2002, **168**(12): 6041 - 6046
- [ 5 ] Fisher P B, Gopalkrishnan RV, Chada S *et al.* mda-7/IL-24, a cancer selective apoptosis inducing cytokine gene: from the laboratory into the clinic. *Cancer Biol Ther*, 2003, **2**(4Suppl 1): S23 - 37
- [ 6 ] Eric YH, Malavi TM, Rahul VG *et al.* Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated(mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties. *Oncogene*, 2001, **20**: 7051 - 7063
- [ 7 ] Sauane M, Gopalkrishnan RV, Lebedeva I *et al.* Mda-7/IL-24 induces apoptosis of diverse cancer cell lines through JAK/STAT-independent pathways. *J Cell Physiol*, 2003, **196**(2): 334 - 345
- [ 8 ] Helmut F, Simon H, Heide K *et al.* The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in immunology*, 2002, **23**: 89 - 95
- [ 9 ] Lebedeva IV, Su ZZ, Sarkar D *et al.* Melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/interleukin-24, induces apoptosis in prostate cancer cells by promoting mitochondrial dysfunction and inducing reactive oxygen species. *Cancer Res*, 2003, **63**(23): 8138 - 8144
- [ 10 ] Jiyuan Chen, Sunil Cheda, Abner Mhashlikar *et al.* Tumor suppressor MDA-7/IL-24 selectively inhibits vascular smooth muscle cell growth and migration. *Molecular Therapy*, 2003, **8**(2): 220 - 229
- [ 11 ] Cao XX, Mohuidin I, Chada S *et al.* Adenoviral transfer of mda-7 leads to BAX up-regulation and apoptosis in mesothelioma cells, and is abrogated by over-expression of BCL-XL. *Mol Med*, 2002, **8**(12): 869 - 876
- [ 12 ] Lebedeva V, Sarkar D, Su ZZ *et al.* Bcl-2 and Bcl-x(L) differentially protect human prostate cancer cells from induction of apoptosis by melanoma differentiation associated gene-7, mda-7/IL-24. *Oncogene*, 2003, **22**(54): 8758 - 8773